

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología I**



**GRIPE A PANDÉMICA H1N1 2009 EN EL HOSPITAL  
CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID : ESTUDIO  
EPIDEMIOLÓGICO Y PAPEL DE LA CARGA VIRAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Jorge Alfredo Pérez García**

Bajo la dirección del doctor  
Juan José Picazo de la Garza

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**GRIPE A PANDÉMICA H1N1 2009 EN EL  
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE  
MADRID: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y  
PAPEL DE LA CARGA VIRAL**

**JORGE ALFREDO PÉREZ GARCÍA**

Tesis Doctoral

Madrid 2011



Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Juan José Picazo de la Garza, Jefe del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, por la tutorización de esta Tesis y por haber demostrado confianza en mi trabajo. Mil gracias, fue un orgullo que quisiera contar conmigo.

De un modo muy especial a la Dra. Esther Culebras, verdadero motor de esta Tesis. Gracias por tu empeño en hacerme Doctor, por tu extremada paciencia, por tu permanente esfuerzo, gracias porque sin tu tesón esto no hubiera sido posible. Todo lo que pueda decir o pensar es insuficiente para expresar mi gratitud, cariño y admiración.

También especialmente al Dr. Jesús Sánchez, residente de Medicina Preventiva del Hospital Clínico San Carlos, por su incondicional ayuda en la elaboración de este documento y por estar siempre dispuesto a dar el mejor consejo. Porque detrás de una apariencia humilde se esconde una excelente persona.

A la Dra. Carmen Betriú, por ser ejemplo de humanidad y de amor a su profesión. Su confianza en mí me sobrepasa y enorgullece. A Iciar y Carmen, por sus consejos y palabras de ánimo durante todo el proceso.

A Emilia, Mar y María Gómez por su excelente trabajo en el laboratorio. A todas las enfermeras y técnicos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos, por hacerme sentir querido desde el primer momento en que llegué al Hospital. A Juani, Aurora, Ana y demás compañeros de escapadas, gracias por vuestro cariño sincero.

Al Dr. José Fereres y a la Dra. Beatriz Peláez, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos en el Servicio de Medicina Preventiva. A Candy y Manolita, por recibirme con los brazos abiertos.

Al Dr. Jorge del Romero y a la Dra. Blanca Menéndez, por su confianza en mí y a todos los trabajadores del Centro Sanitario Sandoval, por su gran acogida y por el cariño demostrado durante el tiempo que trabajé con ellos.

A mi mujer, Mar, por haber sido un constante apoyo cuando no encontraba el camino. Por enseñarme a escuchar el mar. Porque cuando se juntan dos ríos, se hace fuerte la corriente.

A mis padres, Mariano y Conchi, y a mi hermana, Edurne, por sufrir conmigo frustraciones y desengaños. Por haberme dado durante toda su vida mucho más de lo que yo jamás podría soñar.

A Manolo y Gloria, por infundirme ánimos en todo momento y hacerme fuerte ante el desaliento. A los residentes del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Clínico San Carlos por sus consejos y palabras de ánimo.

A las Dras. Pilar Megía y Ana Sánchez-Maroto, por darme la oportunidad, en estos tiempos tan difíciles, de ejercer con orgullo y pasión la profesión de Microbiólogo Clínico. A Eva, Montse, Carmen, Fidel y a todos los compañeros del Laboratorio del Hospital Virgen de Altagracia de Manzanares, por hacerme sentir como en mi casa desde el primer día.

En definitiva, a todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de este trabajo. Y a las que no, también. Gracias a todos.

Última línea juntos, verso acabado..... punto.

**A mi mujer, mis padres y mi hermana**



## **Abreviaturas**





ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CD8	Cluster de diferenciación 8
cop/ml	Copias por mililitro
Ct	Ciclo Umbral (Threshold Cycle)
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
DT	Desviación típica
EMA	European Medicines Agency
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FDA	Food and Drug Administration
HA	Hemaglutinina
HCl	Ácido clorhídrico
ICC	Insuficiencia cardiaca congestiva
kg	Kilogramos
log	Logaritmo decimal
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro magnésico

ml	Mililitro
M2	Proteína de matriz 2
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
NA	Neuraminidasa
nmol	Nanomol
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en reverso
Th	Linfocito T helper
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WHO	World Health Organization
μl	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Grados Celsius

# Índice



	<i>Índice</i>
Índice de tablas	1
Introducción	8
1. Infecciones respiratorias en la comunidad	9
1.1 Importancia de las infecciones respiratorias	9
1.2 Microorganismos más frecuentes	9
1.2.1 Bacterias	9
1.2.2 Virus	10
2. Gripe	12
2.1 Definición	12
2.2 Familia Orthomyxoviridae	12
2.3 Influenzavirus A y B	13
2.3.1 Estructura	13
2.3.2 Material genético	14
2.3.3 Proteínas de membrana	14
2.4 Influenzavirus tipo C	15
2.5 Nomenclatura de influenzavirus	15
2.6 Variaciones antigénicas	15
2.7 Ciclo biológico	16
2.8 Patogenia e inmunidad	17
2.9 Cuadro clínico gripal	17
2.10 Tratamiento	18
2.10.1 Adamantanos	18
2.10.2 Inhibidores de la neuraminidasa	18

	<i>Índice</i>
2.11 Profilaxis	19
3. Gripe A H1N1 2009	20
3.1 Historia de las pandemias	20
3.2 El inicio de una nueva pandemia	21
3.3 Surge una nueva cepa	22
3.4 Efectos de la nueva gripe en el Hemisferio Sur	24
3.5 Epidemiología de la nueva gripe	24
3.6 Inicio de la pandemia en España	25
3.7 Virología y patogenicidad	26
3.8 Mecanismo de transmisión	27
3.9 Manifestaciones clínicas	28
3.10 Carga viral	29
3.11 Grupos y factores de riesgo para enfermedad grave	29
3.12 Diagnóstico	30
3.13 Tratamiento	32
3.14 Vacuna monovalente para la gripe A (H1N1) 2009	
pandémica	34
3.15 Situación de la pandemia en la temporada gripal 2010-2011	36
Objetivos	37
Materiales y métodos	40
1. Procesamiento de muestras	41
1.1 Recepción y procesamiento de las muestras	41
1.2 Centros colaboradores	41

	<i>Índice</i>
2. Recogida de datos epidemiológicos	42
3. Definición de variables	42
4. Extracción de ácidos nucleicos	43
5. Técnicas diagnósticas	44
5.1 PCR a tiempo real (RT-PCR)	44
5.1.1 Procedimiento	44
5.1.1.1 Reactivos	44
5.1.1.2 Mezcla de reacción	45
5.1.1.3 Amplificación	46
5.1.1.4 Detección	46
5.1.2 Cálculo de las cargas virales. Curvas patrón	47
5.2 Detección de gripe A H1N1 2009 por microarrays	49
5.2.1 Procedimiento	49
5.2.1.1 Reactivos	49
5.2.1.2 Amplificación y visualización	50
5.3 PCR clásica para detección de gripe A H1N1 2009	51
5.3.1 Procedimiento	51
5.3.1.1 Reactivos	51
5.3.1.2 Amplificación y detección	52
5.4 Test rápidos inmunocromatográficos	53
5.5 Detección de virus respiratorios por técnicas de Arrays	55
6. Análisis estadístico	59
6.1 Análisis descriptivo y comparación entre los grupos de estudio	59



	<i>Índice</i>
6.2 Análisis multivariante	59
Resultados	61
1. Descriptivo general	62
1.1 Datos generales	62
1.2 Incidencia por semanas	64
1.3 Datos demográficos	65
1.4 Sintomatología	68
1.5 Comorbilidades o antecedentes personales	68
1.5.1 Población sospechosa de padecer	
gripe A H1N1 2009	68
1.5.2 Pacientes con prueba positiva para H1N1 2009	69
1.6 Complicaciones	72
1.7 Ingresos	73
1.8 Infecciones y coinfecciones bacterianas y fúngicas	74
1.8.1 Pacientes con prueba positiva para	
gripe A H1N1 2009	74
1.8.2 Pacientes con prueba negativa para	
gripe A H1N1 2009	75
2. Estudio de los factores de riesgo asociados a padecer	
gripe A H1N1 2009	79
2.1 Análisis univariado	79
2.1.1 Edad	79
2.1.2 Sexo	80

---

2.1.3 Tipo de muestra	80
2.1.4 Sintomatología	80
2.1.5 Comorbilidades o antecedentes personales	82
2.1.6 Complicaciones	85
2.1.7 Coinfecciones	85
2.1.8 Ingreso	85
2.2 Análisis multivariante	87
2.2.1 Población general	87
2.2.2 Mujeres en edad fértil	89
3. Cálculo de las cargas virales	91
3.1 Curvas patrón	91
3.2 Carga viral de las muestras recibidas	93
4. Estudio de la carga viral y factores que la modifican	94
4.1 Análisis univariado	94
4.1.1 Sexo	95
4.1.2 Edad	95
4.1.3 Tipo de muestra	96
4.1.4 Sintomatología	97
4.1.5 Comorbilidades o antecedentes personales	99
4.1.6 Complicaciones	103
4.1.7 Coinfecciones	105
4.1.8 Ingreso	108
4.2 Análisis multivariante	109

5. Estudio de factores predisponentes para padecer neumonía en pacientes con gripe A H1N1 2009	111
5.1 Análisis univariado	111
5.1.1 Factores sociodemográficos	111
5.1.2 Antecedentes personales	111
5.1.3 Cargas virales	112
5.1.4 Coinfecciones	115
5.2 Análisis multivariante	115
6. Utilidad de diversas técnicas diagnósticas para detección de gripe A H1N1 2009	118
6.1 Técnica de Arrays ( <i>CLART® Fluavir</i> )	118
6.2 Técnica de PCR clásica ( <i>Speed Oligo®</i> )	120
6.3 Test rápidos inmunocromatográficos	121
6.3.1 <i>Clearview® Exact Influenza A &amp; B</i>	121
6.3.2 <i>Quick Vue® Influenza A+B</i>	122
7. Estudio de virus respiratorios	123
7.1 Pacientes con prueba positiva para gripe A H1N1 2009	124
7.2 Pacientes con prueba negativa para gripe A H1N1 2009	127
Discusión	129
1. Descriptivo general	130
2. Factores predisponentes para padecer gripe A H1N1 2009	136
2.1 Población general	136
2.2 Mujeres en edad fértil	140

3. Estudio de la carga viral y factores que influyen en ella	141
4. Estudio de factores predisponentes para padecer neumonía en pacientes con gripe A H1N1 2009	147
5. Utilidad de diversas técnicas diagnósticas para determinar gripe A H1N1 2009	152
6. Estudio de virus respiratorios	156
Conclusiones	160
Bibliografía	163



## **Índice de tablas**



<b>Tabla 1.</b> Criterios de positividad/negatividad	
para las muestras detectadas por PCR a tiempo real	47
<b>Tabla 2.</b> Distribución de casos por grupos de edad	67
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de aparición de	
diversos síntomas en la población de estudio	69
<b>Tabla 4.</b> Principales comorbilidades	
encontradas en la población de estudio	70
<b>Tabla 4 (continuación).</b> Principales comorbilidades	
encontradas en la población de estudio	71
<b>Tabla 4 (continuación).</b> Principales comorbilidades	
encontradas en la población de estudio	72
<b>Tabla 5.</b> Principales complicaciones	
aparecidas en la población de estudio	73
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de personas	
ingresadas y exitus en la población de estudio	74
<b>Tabla 7.</b> Microorganismos detectados	
en pacientes con gripe A H1N1 2009	75
<b>Tabla 8.</b> Microorganismos detectados	
en pacientes con gripe A H1N1 2009 negativa	77
<b>Tabla 9.</b> Principales microorganismos detectados	
en pacientes con neumonía y gripe A H1N1 2009 negativa	78
<b>Tabla 10.</b> Principales microorganismos detectados	
en pacientes ingresados en UCI y gripe A H1N1 2009 negativa	78



<b>Tabla 11.</b> Correlación entre la edad (4 grupos) y la posibilidad de padecer gripe A H1N1 2009	79
<b>Tabla 12.</b> Riesgo asociado de padecer la infección según el sexo	80
<b>Tabla 13.</b> Correlación entre el tipo de muestra y la posibilidad de detectar una caso de gripe A H1N1 2009	80
<b>Tabla 14.</b> Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según la sintomatología existente	81
<b>Tabla 15.</b> Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según los antecedentes personales de los pacientes	83
<b>Tabla 15 (continuación).</b> Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según los antecedentes personales de los pacientes	84
<b>Tabla 16.</b> Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según las complicaciones presentes en la enfermedad	86
<b>Tabla 17.</b> Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según ingreso	87
<b>Tabla 18.</b> Factores asociados a padecer gripe A H1N1 2009 en población de estudio. Modelo multivariante de regresión logística	88
<b>Tabla 19.</b> Factores asociados a padecer una gripe A H1N1 2009 en mujeres fértiles (15-50 años). Modelo multivariante de regresión logística	90
<b>Tabla 20.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por edad y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y	

test estadístico correspondiente	95
<b>Tabla 21.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml)	
por grupos de edad y test estadístico correspondiente	96
<b>Tabla 22.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos	
por edad y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml)	
y test estadístico correspondiente	96
<b>Tabla 23.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml)	
por tipo de muestra y test estadístico correspondiente	97
<b>Tabla 24.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por	
tipo de muestra y rango de cargas virales (cop/ml) (dos terciles)	
y test estadístico correspondiente	97
<b>Tabla 25.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml)	
por sintomatología y test estadístico correspondiente	98
<b>Tabla 26.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos	
por sintomatología y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml)	
y test estadístico correspondiente	100
<b>Tabla 27.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml)	
por comorbilidades y test estadístico correspondiente	102
<b>Tabla 27 (continuación).</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml)	
por comorbilidades y test estadístico correspondiente	103
<b>Tabla 28.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos	
por comorbilidades y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml)	
y riesgos asociados	104

<b>Tabla 28 (continuación).</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por comorbilidades y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y riesgos asociados	105
<b>Tabla 29.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por complicaciones y test estadístico correspondiente	106
<b>Tabla 30.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por complicaciones y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y riesgos asociados	107
<b>Tabla 31.</b> Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por ingreso y test estadístico correspondiente	108
<b>Tabla 32.</b> Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por ingreso y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y riesgos asociados	108
<b>Tabla 33.</b> Factores asociados a diferencias en la carga viral de las muestras de pacientes positivos para gripe A H1N1 2009. Modelo multivariante de regresión logística	110
<b>Tabla 34.</b> Distribución de casos de neumonía por edad y sexo y riesgos asociados	111
<b>Tabla 35.</b> Distribución de casos de neumonía por comorbilidades y riesgos asociados	113
<b>Tabla 35 (continuación).</b> Distribución de casos de neumonía por comorbilidades y riesgos asociados	114

<b>Tabla 36.</b> Distribución de casos de neumonía	
por rangos de carga viral (cop/ml) y riesgos asociados	115
<b>Tabla 37.</b> Factores asociados, en pacientes infectados	
por el virus de la gripe A H1N1 2009, para padecer neumonía.	
Modelo multivariante de regresión logística	117
<b>Tabla 38.</b> Resultados de comparativa entre	
técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y	
técnica en estudio (CLART <sup>®</sup> Fluavir) para gripe A H1N1 2009	119
<b>Tabla 39.</b> Resultado de las muestras	
seleccionadas y sus cargas virales correspondientes	120
<b>Tabla 40.</b> Resultados de comparativa entre	
técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y	
técnica en estudio (Clearview <sup>®</sup> Exact Influenza A & B)	122
<b>Tabla 41.</b> Resultados de comparativa entre	
técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y	
técnica en estudio (Quick Vue <sup>®</sup> Influenza A+B)	123
<b>Tabla 42.</b> Distribución de resultados para	
la prueba de arrays de virus respiratorios según el grupo estudiado	124
<b>Tabla 43.</b> Virus identificados con la técnica de arrays de	
virus respiratorios en pacientes con prueba	
para gripe A H1N1 2009 positiva	125
<b>Tabla 44.</b> Virus identificados con la técnica	
de arrays de virus respiratorios en pacientes con prueba	

para gripe A H1N1 2009 negativa	127
---------------------------------	-----

**Tabla 45.** Dobles infecciones víricas detectadas

en pacientes con prueba para gripe A H1N1 2009 negativa, desarrollo de neumonía e ingreso	128
--	-----

# Introducción



## **1. Infecciones respiratorias en la comunidad**

### **1.1 Importancia de las infecciones respiratorias**

Las infecciones respiratorias son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Estas infecciones constituyen uno de los principales motivos de consulta en Atención Primaria (1) y en los servicios de urgencias hospitalarias, donde al menos el 60% de los pacientes que acuden a consulta lo hacen debido a problemas infecciosos, de los que aproximadamente dos de cada tres son de tipo respiratorio (2). Sólo estas infecciones respiratorias representan el 80% del consumo antibiótico que se realiza a nivel extrahospitalario (3).

Los cuadros clínicos que estas infecciones comunitarias pueden provocar varían desde cuadros leves de faringoamigdalitis, bronquitis aguda, crup, bronquiolitis, exacerbaciones de bronquitis crónica, otitis y sinusitis hasta cuadros más graves como neumonías.

### **1.2 Microorganismos más frecuentes**

Los agentes infecciosos causantes de estas infecciones pueden ser víricos o bacterianos.

#### **1.2.1 Bacterias**

Dentro de las bacterias se encuentran como patógenos habituales tanto microorganismos gram positivos como gram negativos. Entre los primeros destaca *Streptococcus pneumoniae*, causa importante de infecciones adquiridas en la comunidad, incluyendo neumonía, otitis media, sinusitis y meningitis bacteriana aguda entre otras. Se encuentra en un alto porcentaje (40%) en otitis media (4) y es, tras *Haemophilus influenzae*, el responsable de las reagudizaciones bacterianas agudas de bronquitis crónica (5).

Otro patógeno habitual del tracto respiratorio superior es el *Streptococcus pyogenes*, agente etiológico de una gran variedad de procesos de diversa gravedad, desde faringoamigdalitis agudas hasta cuadros severos de fascitis necrotizante y shock tóxico estreptocócico.



*H. influenzae* es un importante patógeno causante de infecciones del aparato respiratorio superior e inferior y de cuadros invasores graves, fundamentalmente en niños menores de 5 años. Puede provocar otitis media aguda, sinusitis aguda, neumonías comunitarias y es la primera causa de las exacerbaciones agudas de bronquitis crónica (30-35%) (6).

*Moraxella catarrhalis* es un patógeno oportunista exclusivo en humanos que produce un amplio rango de infecciones como sinusitis, laringitis, traqueítis, otitis media y bronconeumonía, e infecciones más graves como sepsis, endocarditis y meningitis.

*Chlamydophila pneumoniae* es una bacteria gram negativa intracelular obligada. Produce infecciones endémicas en países desarrollados, donde se estima que prácticamente todos las personas la adquieren alguna vez durante su vida. La infección asintomática es la más habitual aunque constituye la segunda causa de neumonía adquirida en la comunidad, junto con *Mycoplasma pneumoniae*.

*M. pneumoniae* es una bacteria causante de neumonías atípicas junto con *C. pneumoniae*. Puede provocar otros cuadros respiratorios como traqueítis, traqueobronquitis, faringitis y miringitis bullosa. Afecta principalmente a niños entre los 5-15 años de edad, representando entre el 30-40% de las neumonías agudas en estos grupos (7).

*Legionella pneumophila* es causa importante de neumonías graves adquiridas tanto en la comunidad como en medio hospitalario, presentándose esporádicamente o bien en forma de brotes.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende géneros con capacidad de provocar infecciones oportunistas de diversa índole, y especies con capacidad infectiva primaria como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, causantes tanto de neumonías comunitarias como hospitalarias.

### 1.2.2 Virus

Existen diversos virus capaces de provocar infecciones respiratorias comunitarias de diversa gravedad.

Los virus influenza A, B y C son los agentes causales de los cuadros clínicos conocidos como gripe o influenza, causantes de epidemias anuales en todo el mundo.

Los virus parainfluenza son causa frecuente de resfriado común de evolución benigna y de, aproximadamente, el 50% de los cuadros de crup. Los virus parainfluenza IV (IVa y IVb) son menos frecuentes y su epidemiología peor conocida. Los virus parainfluenza no causan grandes epidemias, sino brotes moderados en otoño.

Existen alrededor de 52 serotipos de adenovirus humanos. Los adenovirus se asocian a conjuntivitis, rinitis, laringitis, traqueobronquitis o neumonitis, acompañadas de síntomas constitucionales. La fiebre faringoconjuntival, principalmente en niños y jóvenes, puede ser causada por cualquier serotipo y se caracteriza por fiebre, faringitis, conjuntivitis, malestar y linfadenopatía cervical. En población normal son los causantes del 2-4% de enfermedades respiratorias.

El virus respiratorio sincitial tiene un espectro de infección que varía desde un catarro común en adultos a la afectación de las vías respiratorias bajas en niños (bronquitis, bronquiolitis y neumonías). En los lactantes causa el 50% de los casos de bronquiolitis y el 25% de las neumonías.

Los rinovirus son patógenos que, debido a que su capacidad infectiva se reduce a las fosas nasales, sólo son capaces de causar resfriado común. Pueden predisponer a infecciones bacterianas secundarias como sinusitis, otitis media aguda e incluso desencadenar crisis asmáticas en niños susceptibles. Se calcula que estos virus son los causantes de entre el 10-40% de todas las infecciones respiratorias agudas que sufre la especie humana, siendo más frecuente en niños (7).

Los coronavirus producen procesos respiratorios altos, principalmente catarro común. Se calcula que el 10-20% de los resfriados en invierno y primavera son producidos por éstos, cursando en muchas ocasiones como infecciones inaparentes.

Los metapneumovirus humanos son responsables de infecciones respiratorias altas inespecíficas, normalmente autolimitadas en niños y adultos sanos. Pueden asociarse o favorecer crisis asmáticas en niños y agudizaciones de la EPOC. En inmunodeprimidos pueden provocar neumonías potencialmente graves (8).

Algunos enterovirus, como el virus Coxsackie A10, A21, A24, B2, ó como muchos virus ECHO, pueden causar infecciones respiratorias de vías altas tipo faringitis, conjuntivitis, resfriados comunes y crup.

Los bocavirus humanos son causantes de infecciones de vías respiratorias bajas, fundamentalmente en niños, como bronquiolitis y bronquitis. Pueden causar exacerbaciones de asma y neumonías.

## **2. Gripe**

### **2.1 Definición**

La enfermedad conocida como gripe, influenza o flu, afecta a los seres humanos desde el principio de los tiempos. A lo largo de la historia se han registrado periodos de epidemia, siendo especialmente severa la pandemia de 1918-1919, denominada comúnmente como gripe española, y que causó en torno a 50-100 millones de muertes en todo el mundo (9). En 1933 se consiguió aislar el virus y desde entonces se ha ido conociendo mejor la enfermedad y al agente causal de la misma.

### **2.2 Familia *Orthomyxoviridae***

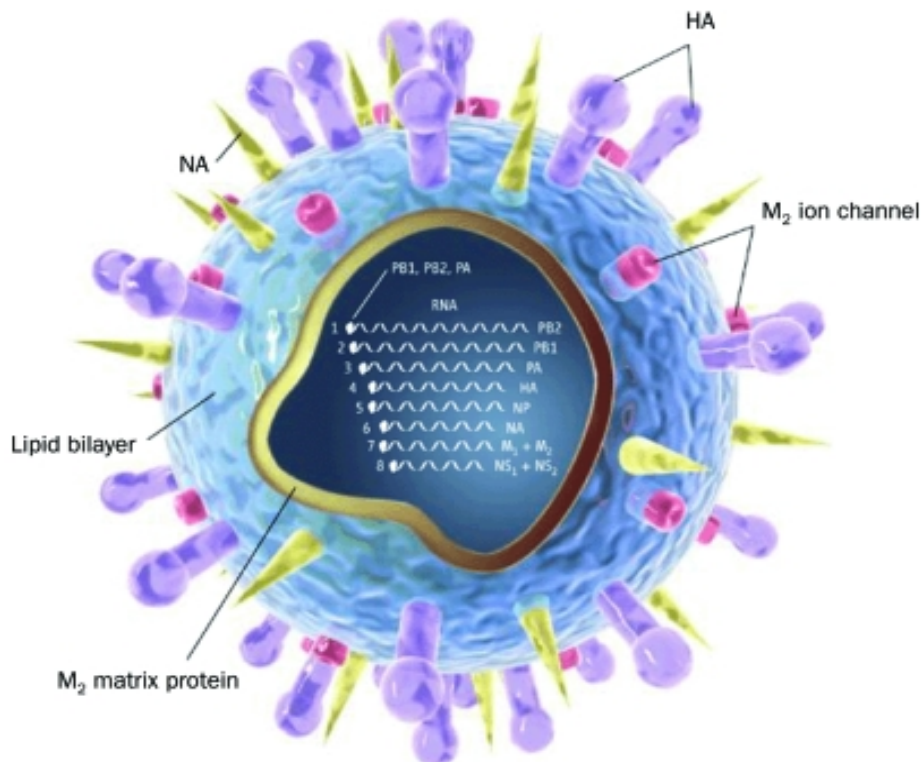
Los virus de las familias *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae* poseen una especial afinidad por los mucopolisacáridos y las glucoproteínas, en particular por los receptores celulares que contienen ácido siálico. Históricamente, los virus pertenecientes a las dos familias se clasificaban dentro de un mismo grupo; sin embargo las diferencias detectadas en estudios posteriores permitieron diferenciarlos, estableciéndose la división actual, en la que se incluyen dentro de la familia *Orthomyxoviridae* los virus influenza A, B y C, y en la familia *Paramyxoviridae* los virus parainfluenza. Dentro de los *Orthomyxoviridae*, el virus influenza C se ha separado recientemente de los

otros dos y ha pasado a considerarse como un género nuevo, debido a las notables diferencias que tiene con los otros dos virus de esta familia.

## 2.3 Influenzavirus A y B

### 2.3.1 Estructura

Los virus influenza A y B son virus envueltos con cinco proteínas internas no glucosiladas: nucleoproteína (NP), proteína de la matriz (M), y tres polimerasas. Poseen también tres proteínas integrales de membrana, conocidas como hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y proteína M2 ó NB. Influenza A y B son indistinguibles morfológicamente, siendo ambos partículas pleomórficas, habitualmente esféricas, de 80-120 nm de diámetro. Los viriones poseen en la superficie de la membrana externa unas proyecciones puntiformes de 10-14 nm de longitud formadas por las proteínas HA y NA. La nucleocápside viral es de simetría helicoidal y tiene una longitud de 30-110 nm (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura de un virus influenza. Imagen tomada de Science (10).

### **2.3.2 Material genético**

El material genético de ambos virus está compuesto por 8 segmentos de ARN monocatenario complementarios al ARN mensajero. Estos segmentos codifican al menos 10 polipéptidos de los que ocho son proteínas estructurales del virus y otras dos proteínas que aparecen en las células infectadas (NS1 y NS2). Los tres fragmentos mayores de ARN (1, 2 y 3) codifican las polimerasas virales PA, PB1 y PB2, responsables de la síntesis de ARN. PB1 y PB2 están implicadas en las funciones de iniciación y elongación durante la transcripción de ARN, mientras que PA está implicado en la replicación del ARN viral. Las tres proteínas se encuentran asociadas a la NP y al ARN viral formando un complejo de replicación.

### **2.3.3 Proteínas de membrana**

La proteína HA está codificada por el segmento 4 de ARN viral y es la causante de la unión del virus a la célula, de su penetración y de la fusión de membranas. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a HA tienen un papel crucial en la inmunidad frente a la infección, de forma que una variación en esta molécula permite al virus evadir la respuesta inmune del huésped adquirida con anterioridad bien por una infección ó por una vacunación previa. El virus Influenza A tiene tres subtipos de HA (H1, H2, H3) que han circulado o circulan habitualmente en humanos, aunque puede aparecer algún otro subtipo de forma ocasional.

La glucoproteína NA está codificada por el fragmento 6 de ARN. Se cree que su actividad permite la penetración del virus a través de la capa mucosa hasta alcanzar las células epiteliales del tracto respiratorio. La NA elimina además el ácido siálico del virus y de las células infectadas, evitando la autoagregación y permitiendo la liberación de los viriones. Los anticuerpos dirigidos contra la NA no neutralizan la infectividad del virus excepto a altas concentraciones, pero restringen el nivel de replicación viral y atenúan la enfermedad. Los virus influenza A poseen dos subtipos de NA que han afectado a humanos (N1 y N2).

El segmento 7 de ARN codifica las proteínas M (o M1) y M2. La proteína M es la más abundante en las partículas virales y se encuentra bajo la envoltura lipídica del virus. Esta proteína tiene una actividad estructural en el control de la actividad ARN-polimerasa viral y participa en el ensamblaje del virus interactuando con HA y NP. Su significado en lo referente a la inmunidad es incierto. La proteína M2 aparece en grandes cantidades en las células infectadas, pero en pequeña cantidad en el virión maduro. Es a su vez un canal de protones que realiza funciones esenciales en la maduración y en la liberación de las membranas del virus. Interviene en el cambio conformacional de HA que permite la fusión de membranas. Su papel en la inmunidad también es desconocido (7).

## **2.4 Influenzavirus tipo C**

Aunque los virus influenza C son similares a los virus A y B, contienen solo 7 fragmentos de ARN y poseen solamente una glucoproteína de superficie, con funciones de hemaglutinación, estearasa y de fusión. Los virus C no tienen, además, actividad NA.

## **2.5 Nomenclatura influenzavirus**

La nomenclatura de los virus influenza incluye el tipo de virus influenza, el huésped de origen en las cepas no humanas, el origen geográfico, el número de cepa y el año de aislamiento. Además, suele describirse el tipo antigénico de HA y de NA entre paréntesis detrás del año de aislamiento, por ejemplo A/Hong Kong/1/68 (H3N2). Hasta la fecha, se han identificado 16 hemaglutininas (H1-H16) y 9 neuraminidasas (N1-N9) (9).

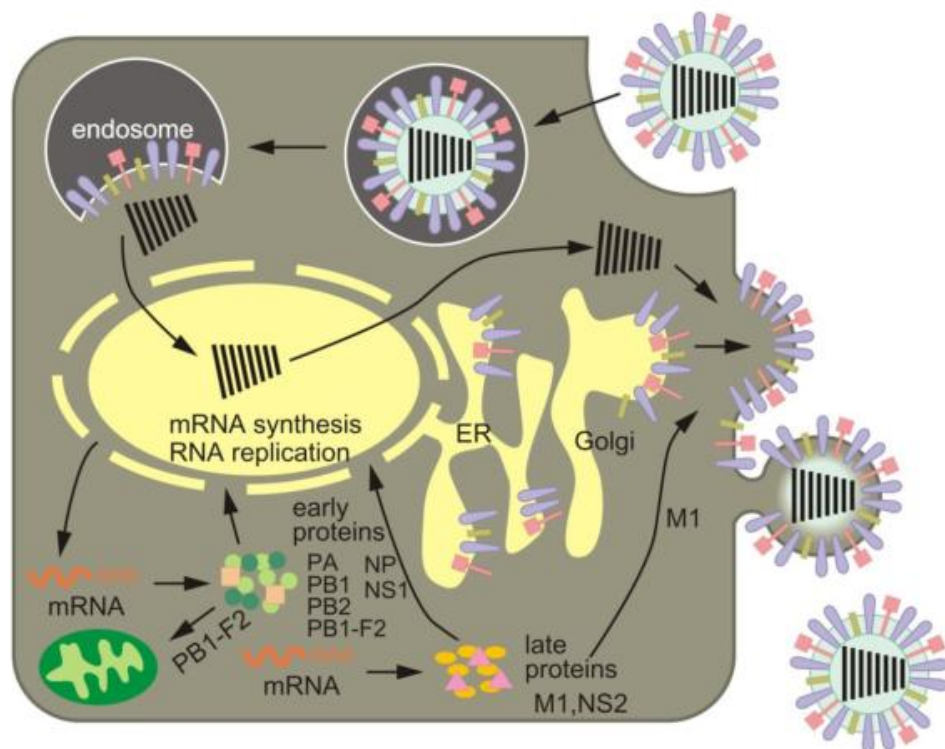
## **2.6 Variaciones antigénicas**

Existen dos tipos de variaciones antigénicas en los virus influenza que permiten evadir la respuesta inmune preexistentes. En primer lugar, las denominadas variaciones antigénicas mayores o SHIFT, que se deben a variaciones en el subtipo de HA o de NA, y que ocasionan variantes para las que la población general no tiene ningún tipo de inmunidad previa. Estos cambios suelen asociarse a pandemias, como la aparición del virus H1N1 en 1918, el H2N2 en 1957 o el H3N2 en 1968. Las variaciones antigénicas

menores o deslizamientos antigénicos (DRIFT) se deben a mutaciones puntuales en los genes de HA o de NA pero dentro del mismo subtipo. Estas mutaciones son las causantes de epidemias anuales y a menudo reducen la efectividad de las vacunas de temporadas anteriores (11).

## 2.7 Ciclo biológico

El ciclo biológico del virus comienza con la unión a los receptores celulares. Posteriormente el virus penetra en la célula por endocitosis. En el pH bajo del endosoma se libera la ribonucleoproteína y la membrana externa del virus se fusiona con la del endosoma, liberando el contenido viral al citoplasma celular. El ARN viral se transporta al núcleo celular y allí se produce ARNm, que dará lugar a las proteínas del virión. Se produce un nuevo ARN viral, que es encapsidado y transportado a puntos de la superficie celular donde NA y HA se incorporan a la membrana celular. La progenie viral se libera por gemación de forma que, en principio, la célula no muere (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de los virus influenza. Imagen tomada de Neumann *et al.* (12)

## **2.8 Patogenia e inmunidad**

El reservorio de los virus influenza A es múltiple, abarcando diferentes tipos de animales, tanto domésticos como salvajes, entre ellos 16 tipos de mamíferos (12;13). La fuente de infección es habitualmente el enfermo. El virus se encuentra en las secreciones respiratorias desde el periodo de incubación, siendo el periodo de máximo contagio los 3 primeros días del cuadro clínico. La vía de transmisión del virus es directa a través de las microgotas emitidas por las vías aéreas. La baja dosis infectante, su alta concentración en las secreciones y la tos que aparece en el cuadro clínico explicarían el elevado contagio de esta enfermedad.

La virulencia de una cepa de virus gripal se basa en su infectividad para un determinado sistema celular o tejido, en su transmisibilidad o capacidad de difusión y, en el caso de la infección por virus influenza A, en su gama de huéspedes. La HA es el principal causante del poder patógeno del virus. Puede encontrarse como precursor o activada, siendo en este último caso cuando el virus es infectante. Su activación es el resultado de su fragmentación proteolítica por enzimas del tipo de la tripsina, existentes en las células infectadas por el virus. Además la HA se une a los receptores que contienen ácido siálico presentes en las células del epitelio respiratorio a través de su fragmento HA1. Por otra parte, la HA provoca la unión de membranas y participa en la penetración.

Las proyecciones de NA intervienen también en la infectividad, pero sus funciones son menos conocidas. Cooperan en la fusión y penetración viral y tienen un papel primordial en la liberación del virus de la célula y en la difusión de célula a célula (7).

## **2.9 Cuadro clínico gripal**

El cuadro clínico que aparece en la mayoría de los enfermos es el del síndrome gripal no complicado. Es un cuadro que puede estar causado por otros virus, como en el caso del virus respiratorio sincitial, por lo que no siempre se relaciona con gripe. Se caracteriza por un periodo de incubación de 1-2 días y un comienzo normalmente brusco con fiebre, escalofríos, cefalea,



mialgias, malestar general y anorexia. Los síntomas sistémicos suelen durar alrededor de 3 días, pudiendo aparecer también tos, rinorrea y dolor de garganta. Estos síntomas suelen hacerse más prominentes al desaparecer los síntomas sistémicos.

Las complicaciones más importantes son la neumonía (viral primaria o bacteriana secundaria), exacerbaciones de broncopatía crónica, crup, miositis etc. Especialmente llamativo es el Síndrome de Reye, cuadro multiorgánico particularmente grave que se ha asociado a la toma de ácido acetilsalicílico por estos pacientes y que es más frecuente en las infecciones por virus influenza B.

## **2.10 Tratamiento**

Existen dos tipos de antivirales para el tratamiento de la gripe (14):

### **2.10.1 Adamantanos**

La amantadina y la rimantadina son aminas primarias que interfieren en la pérdida de la cubierta del virus por interacción con la proteína M2 de la matriz. La sustitución de un solo aminoácido de dicha proteína da lugar a fenómenos de resistencia. Se utilizan para controlar los brotes hospitalarios, así como para proteger a pacientes con inmunosupresión ya vacunados. No son útiles frente al virus influenza B. Producen escasos efectos adversos en sujetos adultos normales, pero pueden aparecer problemas graves en ancianos, inmunodeprimidos o pacientes con alteraciones renales. Están contraindicados durante el embarazo.

### **2.10.2 Inhibidores de la neuraminidasa**

El zanamivir y el oseltamivir son análogos del ácido siálico capaces de inhibir selectivamente la neuraminidasa de los virus influenza A y B, impidiendo la liberación de las partículas virales de las células infectadas. Se administran por inhalación o por vía oral y son efectivos para el tratamiento y profilaxis del cuadro gripal agudo. Presentan una buena tolerancia, pero en individuos con insuficiencia respiratoria crónica pueden producir broncoespasmos.

## **2.11 Profilaxis**

Las vacunas antigripales disponibles en España son vacunas inactivadas, trivalentes, compuestas por dos subtipos del virus influenza A (clásicamente se ha incluido una cepa H1N1 y una H3N2) y uno del B. Existen vacunas de virus enteros, fraccionados y de antígenos de superficie o subunidades. Estas últimas son menos reactógenas, por lo que se recomiendan para menores de 13 años. Estas vacunas deben actualizarse cada 1-3 años para poder introducir los cambios antigénicos en HA y NA de los nuevos virus circulantes de cada año (15). La OMS publica anualmente la composición de la vacuna en función de los resultados de la vigilancia epidemiológica. Existe una vacuna de virus vivos atenuados intranasal comercializada en EEUU y aprobada para su uso en individuos sanos de 2 a 49 años. Las vacunas atenuadas provocan respuesta humoral y celular, por lo que parecen ser más efectivas que las inactivadas. De hecho, en niños y adolescentes, esta vacuna atenuada proporciona mejor protección que las vacunas inactivadas (16).

La efectividad de la vacuna depende de la edad, de la inmunidad y del grado de similitud entre los virus vacunales y circulantes. Cuando la similitud es alta, la efectividad vacunal es del 70-90% en personas sanas menores de 65 años. En personas mayores de 65 años y en las que padecen enfermedades crónicas, la inmunogenicidad vacunal es inferior, con una efectividad del 50%. Aun así, la efectividad de la vacuna en estos grupos de riesgo en la prevención de ingresos hospitalarios y de neumonías es del 50% al 60%, y del 80% en la prevención de la muerte por complicaciones de la gripe.

Todas las vacunas se obtienen a partir del crecimiento de los virus purificados en huevos embrionados y se inactivan con formaldehído o betapropiolactona. Como conservante suele usarse tiomersal y pueden contener neomicina.

Los efectos adversos, en general, no son importantes, y se limitan a reacciones locales como dolor, inflamación, eritema o induración de la zona de inoculación durante 1 ó 2 días. La fiebre u otras reacciones sistémicas son poco frecuentes y suelen presentarse en personas que no habían estado

previamente expuestas a los antígenos de los virus de la vacuna (generalmente niños).

Las reacciones alérgicas son infrecuentes y se deben a hipersensibilidad a algún componente de la vacuna, en general el huevo.

La vacuna antigripal está contraindicada si existe alergia a las proteínas del huevo, en niños menores de 6 meses y en personas con antecedentes de Síndrome de Guillain-Barre en las seis semanas posteriores a la administración de la vacuna antigripal.

Existen diferentes líneas de investigación para la obtención de nuevas vacunas de la gripe. Se están realizando ensayos en la obtención de una vacuna “universal”, basados en la proteína M2 de la matriz del virus, zona antigénicamente muy conservada de unos virus a otros, con resultados prometedores (17). Esta vacuna evitaría la necesidad de preparación de nuevas vacunas cada temporada invernal.

### **3. Gripe A H1N1 2009**

#### **3.1 Historia de las pandemias**

La historia conocida de las infecciones por virus influenza A H1N1 comienza en 1918. Fue entonces cuando un virus que se creía afectaba a aves empezó a infectar a humanos (18). Durante la segunda oleada de la pandemia se observó que existía una epidemia de similares características en cerdos. Fue un veterinario, Shope, el que lanzó la teoría de que ambas epidemias podían estar provocadas por un virus similar, hecho que más tarde se ha podido constatar en otros trabajos de investigación más recientes (19;20). Esta gripe, denominada comúnmente como gripe española, fue la causante de en torno a 50-100 millones de muertes en todo el mundo (9). Posteriormente, las cepas de virus influenza porcina y humana se separaron antigénicamente y los virus H1N1 han continuado infectando humanos en epidemias anuales (21).

En 1957, el virus H1N1 fue reemplazado por una nueva cepa H2N2, que combinaba material genético de su predecesor H1N1 y de un virus de la influenza aviar (22). Esta nueva cepa causó una nueva pandemia a la que se

llamó gripe asiática y a la que se le atribuyeron en torno a 2 millones de muertes.

En 1968, una nueva pandemia de gripe apareció en el Sudeste Asiático. Se le denominó gripe de Hong Kong. Este virus se diferenció de su predecesor por presentar un cambio en el tipo de hemaglutinina (pasó de H2 a H3), manteniéndose la neuraminidasa (23). Esta gripe se caracterizó por ser menos virulenta que su antecesora; aún así se le atribuyeron alrededor de un millón de muertes.

En 1976 se produjo una reemergencia de virus H1N1 en un brote que afectó a 230 soldados en Fort Dix, NJ, provocando una muerte (24;25). El virus no se extendió a la población civil. Un año más tarde, otra cepa de virus A H1N1 emergió en China, Hong Kong y la Unión Soviética (25). Se piensa que esta epidemia fue provocada por un laboratorio de forma accidental y causó síntomas leves predominantemente en gente joven (25;26).

Desde 1977, los virus H1N1 han contribuido a las epidemias anuales de gripe en todo el mundo, aunque muy minoritariamente en comparación con las cepas H3N2, predominantes desde 1968 hasta el año 2009.

### **3.2 El inicio de una nueva pandemia**

El 21 de Abril de 2009, el CDC de Atlanta confirmó la existencia de 2 casos de gripe asociados a un nuevo virus en Estados Unidos en dos niños residentes en California, muy cerca de la frontera con México (27). Se descubrió que los dos aislados virales eran genéticamente similares, resistentes a amantadina y rimantadina y que poseían una nueva combinación genética de segmentos procedentes de virus porcinos circulantes en EEUU desde 1999, genes de virus porcinos de linaje Euroasiático y genes de virus de origen aviario. Ninguno de los dos niños había estado en contacto con cerdos, indicando la capacidad del virus de transmitirse de humano a humano (28).

Desde Marzo de ese mismo año, se venía observando en varias zonas de México un aumento en el número de casos de enfermedades respiratorias que cursaban con síndrome gripal. El Ministerio de Salud Mexicano comunicó el 23 de Abril a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) varios casos confirmados de enfermedad respiratoria grave provocados por virus de la gripe

A (subtipo H1N1) de origen animal, concretamente de origen porcino. Tras el estudio de su secuencia genética se descubrió que estos pacientes estaban infectados con la misma cepa identificada en los 2 niños diagnosticados en California (29).

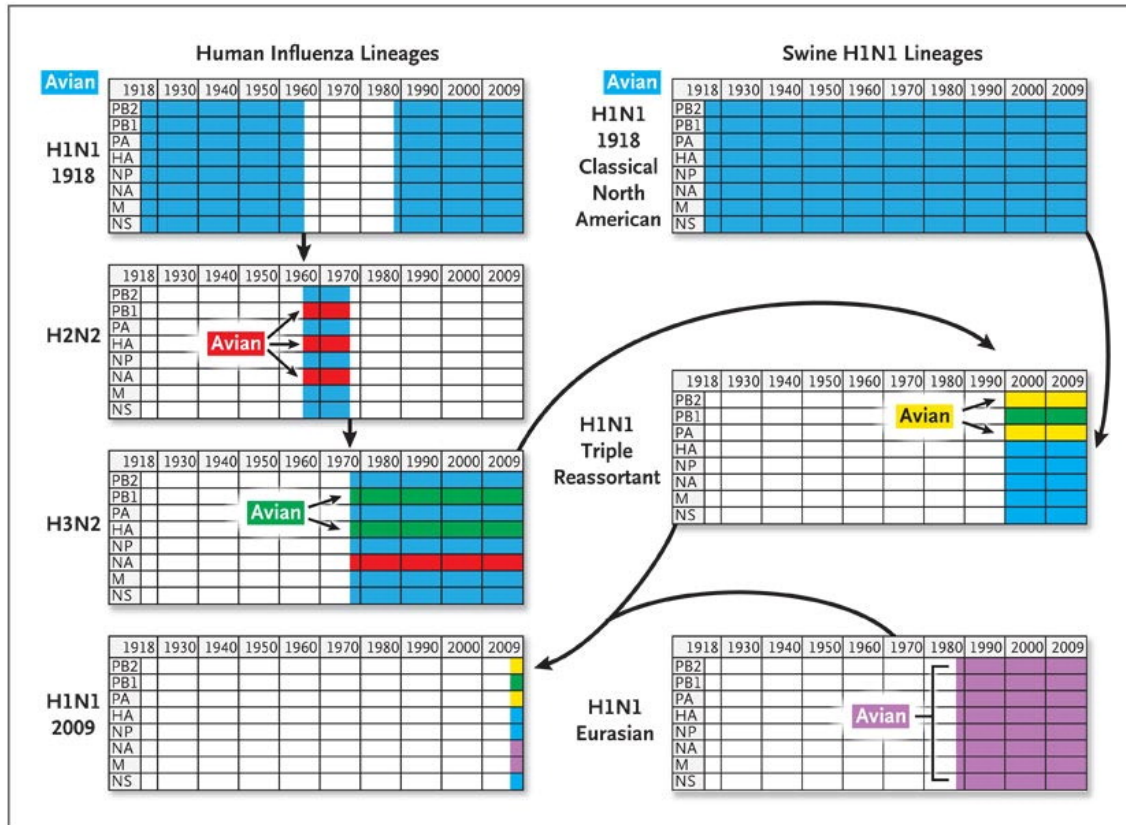
A raíz de estos acontecimientos, el 25 de Abril la OMS calificó este brote epidémico por un nuevo virus de la gripe A H1N1, denominado A (H1N1)v, como urgencia de salud pública de importancia internacional. Apenas dos días después, la OMS elevó el nivel de alerta pandémica a la fase 4, al comprobarse la transmisión interhumana capaz de provocar brotes. Al verificarse la transmisión interhumana del virus en al menos 2 países de una región de la OMS, se elevó el nivel de alerta a fase 5. Finalmente, el 11 de Junio de 2009, con cerca de 30000 casos confirmados en 74 países, la OMS estableció la fase 6 de alerta pandémica (30), tras comprobar la existencia de transmisión elevada y sostenida del virus en todo el mundo.

Desde ese momento empezaron a declararse casos confirmados en todo el mundo, si bien no se alcanzaron niveles epidémicos en el hemisferio Norte hasta el mes de Octubre.

### **3.3 Surge una nueva cepa**

En el año 1998, un nuevo virus porcino trirreasantante se identificó en población porcina de Norteamérica. Este nuevo virus contenía 5 segmentos genéticos de la cepa clásica A/H1N1 Norteamericana (31;32). El primer caso de infección humana con esta cepa trirreasantante se detectó en el año 2005 en un adolescente de Wisconsin (EEUU) con antecedentes de haber estado sacrificando un cerdo (31). Posteriormente se detectaron otros 10 casos con antecedentes de contacto directo con cerdos. No se produjo ninguna muerte, pero alguno de los pacientes desarrolló infecciones graves del tracto respiratorio inferior y diarrea.

La nueva cepa del virus H1N1 2009 proviene de la recombinación de 6 segmentos genómicos de la cepa trirreasantante de origen porcino y 2 segmentos del linaje Euroasiático porcino (18;33) (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura de la nueva variante de gripe A H1N1 2009. Imagen tomada de Zimmer *et al* (18).

La emergencia del virus de la influenza A H1N1 2009 es un acontecimiento sin precedentes en la historia de la virología moderna. Este virus no se ciñe a la definición clásica de nuevo subtipo para el que la mayoría de la población no tendría inmunidad previa. Desde 1977 los subtipos H1N1 han permanecido en constante circulación y, la mayoría de las personas nacidas antes del año 1956 han tenido contacto previo con cepas H1N1 en la era anterior al predominio de cepas H2N2 y, por tanto, tienen cierta inmunidad frente a esta nueva variante. Tampoco se puede hablar en este caso de que se haya producido un clásico Drift antigénico, ya que esta cepa no tiene relación evolutiva directa con las cepas H1N1 circulantes en humanos en los últimos años (12).

### **3.4 Efectos de la nueva gripe en Hemisferio Sur**

El Hemisferio Sur sufrió antes la onda pandémica, desde los meses de mayo a octubre, con un pico estacional entre los meses de Junio y Julio. La duración de la temporada de gripe, donde la nueva variante de gripe fue la predominante, fue similar o ligeramente superior a una temporada habitual. La mayoría de los casos presentaron una forma clínica leve, siendo el grupo más afectado el de los niños de 5 a 14 años, seguidos de los niños menores de 5 años y del grupo de 15 a 59 años; en todos los casos se observó un patrón muy similar al de la gripe estacional (34;35).

### **3.5 Epidemiología de la nueva gripe**

El 11 de Septiembre de 2009, más de 277.607 personas en más de 170 países de todo el mundo habían dado positivo para la prueba del virus de la gripe A H1N1 2009 (36). Las tasas de enfermedad grave, hospitalización y muerte atribuidas al nuevo virus, fueron parecidas tanto en el hemisferio Norte como en el Sur. El patrón de hospitalización por enfermedad grave fue diferente al de la gripe estacional que habitualmente presenta las tasas más altas de hospitalización en los niños menores de dos años y en personas mayores de 65. Por el contrario, la mayoría de los casos graves de infección por gripe A H1N1 2009, se presentaron en personas jóvenes y adultos menores de 60 años, con edades medias de 35 y 45 años (37;38). En cuanto a la proporción de casos que ingresaron en UCI, en Nueva Zelanda el 33% de los casos de gripe tuvieron que ser atendidos en servicios de cuidados intensivos (34). Otros datos mostraban que los pacientes con mayor riesgo de padecer una enfermedad grave o incluso la muerte eran las personas que por edad se encontraban en los extremos de la vida (<2 años y >65) y aquellas que presentaban algún tipo de enfermedad crónica de base. También se ha ido confirmando la existencia de un mayor riesgo de padecer complicaciones en mujeres embarazadas (39-42). Un factor de riesgo adicional que no se había observado en otras epidemias de gripe y que si parece tener importancia en ésta, es la obesidad (índice de masa corporal  $>30 \text{ kg/m}^2$ ) (41;43).

Las tasas de enfermedad atribuibles al virus de la gripe A H1N1 han ido variando con el tiempo. Durante un brote en Nueva Zelanda, la tasa de ataque

de la enfermedad se estimó en un 7,5% y la tasa global de infección en un 11% (34). En un estudio realizado en Pittsburg (EEUU), después de un pico en una segunda ola de infección, se observó que la seroprevalencia de anticuerpos frente al virus A H1N1 2009 se situaba en un 21% de las personas analizadas y en un 45% de aquellas entre 10 y 19 años que habían padecido la infección (44).

La tasa de mortalidad total ha sido inferior al 0,5%. El amplio rango de estimaciones realizadas de esta tasa (0,0004 a 1,47%), refleja la incertidumbre con respecto a los casos reales y el número de infecciones (45-47). En EEUU la tasa de mortalidad en casos sintomáticos de enfermedad se estimó en 0,048%(48) y en 0,026% en el Reino Unido (49). A diferencia de lo que sucede con la gripe estacional, la mayoría de los casos graves han ocurrido en niños y en adultos jóvenes, y aproximadamente el 90% de las muertes se dieron en personas por debajo de los 65 años de edad.

Las tasas de hospitalización y muerte (50) varían considerablemente de unos países a otros. Sin embargo en todos los estudios realizados y como ya se ha comentado con anterioridad, estas tasas han sido más altas para niños menores de 5 años (50), especialmente para los menores de 1 año, y más bajas para los mayores de 65 años (51). En EEUU, del 32 al 45% de los pacientes ingresados por un caso confirmado de gripe A H1N1 2009, tenían una edad inferior a 18 años (51;52). Se estima que del 9 al 31% de los pacientes hospitalizados necesitaron cuidados intensivos, y, aproximadamente, entre el 14 y el 46% de ellos fallecieron (51-55).

### **3.6 Inicio de la pandemia en España.**

Los primeros casos confirmados de infección por el virus de la gripe A H1N1 2009 en España se detectaron en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III), y fueron notificados el 26 de Abril del 2009. Todos correspondían a jóvenes con antecedentes de viaje reciente a México. Durante estos primeros días del brote se pusieron en marcha diversos planes de contingencia basados, principalmente, en la vigilancia epidemiológica y en la adopción de medidas de control de brotes. Se establecieron sistemas de detección precoz y respuesta rápida, con protocolos que integraron las



actividades de los servicios de salud pública y asistencial y el apoyo de los laboratorios de referencia para la gripe. A raíz de la declaración de fase 6 de alerta por parte de la OMS, las estrategias de vigilancia epidemiológica se orientaron a definir escenarios que ayudaran a los sistemas sanitarios a dar una respuesta rápida y eficaz a esta urgencia. Por lo tanto se incidió no solo en la creación de sistemas de planificación de servicios asistenciales que redujeran la transmisión y el número de personas afectadas, sino también en la identificación y protección de los grupos de población más vulnerables (56).

A finales del mes de Septiembre del 2009 en España se habían registrado un total de 305 casos graves de infección por el virus de la gripe A (H1N1) 2009, 137 de los cuales habían ingresado en UCI. Hasta esa misma fecha se habían notificado al Ministerio de Sanidad y Política Social 36 casos de personas fallecidas en España a causa del nuevo virus. La edad media de los fallecidos era de 41,64 años, con una mediana de 35,5 años y un rango de 10 a 85 años (57).

### **3.7 Virología y patogenicidad**

Tal y como se ha comentado en el punto 3.3 de la introducción, el nuevo virus de la gripe A H1N1 2009 proviene del reagrupamiento genético de diferentes linajes que han ido circulando en cerdos en el último tercio del siglo XX. Por tanto es un hecho ya conocido el papel que desempeñan estos animales como mediadores en la formación de nuevos virus de la gripe que posteriormente infectan a humanos.

La capacidad patogénica del nuevo virus está aún bajo discusión. Estudios realizados en modelos animales (ratones, primates y hurones) muestran que la cepa de referencia del virus A H1N1 2009 replica más eficazmente y causa lesiones patológicas en pulmón más graves que distintas cepas del virus A H1N1 humano estacional (58;59).

El papel protector que pueda conferir la vacuna estacional previa y la exposición a otros virus A H1N1 tampoco está totalmente claro. En un estudio realizado en EEUU con serotecas de donantes anónimos nacidos entre 1880 y 2004, se demostró que hasta un 11% de las personas mostraban anticuerpos

neutralizantes frente al virus A H1N1 2009. En el grupo de los mayores de 60 años se encontraron un 63% de pacientes con una titulación superior a 40, mientras que en el grupo de menores de 30 años sólo el 4% alcanzaba estos niveles (60). Por otro lado, en regiones de China donde prácticamente la casi totalidad de la población no recibe vacunación estacional frente a la gripe, el porcentaje de individuos con anticuerpos neutralizantes es mucho menor (sólo del 3%), por lo que algunos autores indican que puede ser la vacunación frente a la gripe estacional, y no la exposición previa a un virus similar, el principal factor desencadenante de la aparición de una protección parcial frente al nuevo virus (61). Sea como fuere, parece claro que ambas teorías podrían explicar el hecho objetivamente observado de la menor incidencia del virus A H1N1 2009 en mayores de 60 años.

El papel de la inmunidad celular en el desarrollo de la enfermedad también es objeto de discusión. Se ha comprobado que la mayoría de los epítomos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II de la nucleoproteína y de la proteína de matriz, y algunos de la hemaglutinina del A H1N1 2009, están totalmente conservados respecto a los de las cepas estacionales y, por tanto, exposiciones anteriores al virus, por vacunación o infección natural, podrían activar la respuesta inmunitaria celular, aumentando la respuesta de linfocitos T CD8+ y de células T colaboradoras Th1. En consecuencia, la carencia o los defectos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad podrían explicar la variabilidad entre pacientes en la respuesta ante la infección gripal y la mayor o menor gravedad de la misma (62).

### **3.8 Mecanismo de transmisión**

El mecanismo de transmisión del virus de la gripe AH1N1 es el mismo que el de la gripe estacional. Posee una gran transmisibilidad vía aérea, por medio de las gotas que se expulsan al toser o estornudar, fundamentalmente por gota de Flügge. También puede transmitirse por contacto directo de superficies contaminadas con secreciones de una persona infectada.

### 3.9 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación del virus se estima en torno a 1,5 a 3 días (63), similar al de la gripe estacional.

La infección del virus de la gripe A H1N1 2009 presenta un amplio abanico de síndromes, desde infecciones afebriles del tracto respiratorio superior a neumonías virales fulminantes. Entre un 8 y un 32% de las personas infectadas han presentado una forma leve de enfermedad (64). La mayoría de los pacientes que necesitaron atención médica mostraron síntomas típicos de infección por virus de la gripe, como fiebre, tos, odinofagia y rinorrea (52;64-66). La sintomatología gastrointestinal fue más habitual que en episodios de gripe estacional, principalmente en adultos. Los síntomas sistémicos también son bastante frecuentes.

La complicación más común que se puede presentar es la neumonía que, en algunos casos, puede ir acompañada de enfermedad necrotizante o empiema (38). Otras complicaciones que pueden aparecer son la deshidratación, encefalopatías y exacerbaciones de enfermedades crónicas subyacentes (39).

El principal cuadro clínico que provoca la hospitalización y la necesidad de cuidados intensivos es la neumonitis viral difusa, asociada con hipoxemia severa, síndrome de distress respiratorio agudo y en algunas ocasiones shock y fallo renal (54;55).

Otros cuadros que también pueden aparecer son las exacerbaciones de EPOC ó asma, coinfecciones bacterianas y descompensaciones de enfermedades previas existentes. La aparición de neumonías bacterianas, la mayor parte de las veces provocadas por *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pyogenes*, se ha sospechado o diagnosticado en torno al 20-24% de los pacientes hospitalizados en la UCI, y ha podido confirmarse en un rango de entre el 26-38% de los pacientes que murieron (54;55;67;68). Está demostrado que las infecciones respiratorias provocadas por los virus de la influenza pueden complicarse por infecciones bacterianas secundarias (69). La infección con el virus de la influenza puede desarrollar un cuadro grave de la

enfermedad, y las muertes se pueden vincular, en muchas ocasiones, a la coinfección con patógenos bacterianos (69-74).

Los hallazgos radiológicos más comunes han sido los infiltrados intersticiales y alveolares mixtos difusos, aunque también se ha encontrado afectación uni y multilobar, especialmente en pacientes con coinfecciones bacterianas (75).

### **3.10 Carga viral**

Los estudios de carga viral en muestras remitidas de pacientes sospechosos de padecer gripe son escasos y por ende lo son aún más los estudios con gripe A H1N1 2009. El clásico diagnóstico clínico de la gripe ha hecho difícil, durante años, la recepción en los laboratorios de Microbiología Clínica de muestras que permitieran realizar un diagnóstico microbiológico. A raíz de la pandemia del año 2009, el diagnóstico de la gripe A H1N1 se realiza por técnicas moleculares, lo que posibilita el cálculo de la carga viral. Así, y como ocurre con otras infecciones víricas, se abre un campo interesante para el estudio de la correlación entre carga viral y comportamiento inmunopatogénico del virus.

La mayoría de los trabajos publicados que evalúan la carga viral del virus de la gripe A H1N1 2009, lo hacen desde el punto de vista de la excreción del virus a lo largo del tiempo de convalecencia y como marcador de la eficacia del tratamiento antiviral (76;77).

Algunos estudios, sin embargo, han tratado de relacionar los valores de la carga con la sintomatología y la evolución a enfermedad grave. En estos trabajos, se ha observado que los pacientes con neumonía tenían cargas virales más altas que aquellos con enfermedades del tracto respiratorio superior (78).

### **3.11 Grupos y factores de riesgo para enfermedad grave**

Los mismos factores que pueden provocar complicaciones en las epidemias de gripe estacional son los que se encuentran en las infecciones causadas por este virus. Entre los factores de riesgo para desarrollar una

infección grave por virus de la gripe A H1N1 2009 se encuentran la edad inferior a 5 años, el embarazo, las enfermedades crónicas cardiovasculares (insuficiencia cardíaca congestiva y aterosclerosis fundamentalmente), las enfermedades crónicas pulmonares (asma o EPOC), los desordenes metabólicos como la diabetes, las enfermedades neurológicas (enfermedad neuromuscular, neurocognitiva, crisis comiciales), la inmunosupresión (VIH, trasplante de órganos, quimioterapia, corticoides o malnutrición), la obesidad mórbida, las hemoglobinopatías, la enfermedad renal crónica (diálisis ó trasplante), la enfermedad hepática crónica (cirrosis), ser fumador, mayor de 65 años y niños con tratamiento a largo plazo con aspirina (75).

Los grupos que han presentado una mayor incidencia de infección grave entre los grupos de riesgo han sido las mujeres embarazadas, especialmente aquellas que en el momento de la infección se encontraban en el 2º ó 3er trimestre, las mujeres con menos de dos semanas postparto y los pacientes con inmunodepresión ó desordenes neurológicos (51;52;55;79).

Aunque las mujeres embarazadas representan únicamente el 1-2% de la población, ha sido el grupo que ha aglutinado del 7-10% de los casos hospitalizados (52;79) de gripe A H1N1 2009, del 6-9% de pacientes que necesitaron UCI (54;55) y del 6-10% de pacientes que fallecieron (51;79). Además parece existir un mayor riesgo de muerte en aquellas mujeres embarazadas infectadas durante el tercer trimestre y en aquellas coinfectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (80).

La obesidad severa y la obesidad mórbida también han demostrado ser factores predisponentes de enfermedad grave; algunos estudios atribuyen a las personas con estas comorbilidades entre 5 a 15 veces más de riesgo que la población general (51;54;55;81).

### **3.12 Diagnóstico**

Durante la fase pandémica, el diagnóstico virológico se centró en 2 objetivos fundamentales: asistencialmente, en el estudio de los casos graves que requirieron hospitalización y de otros grupos de riesgo especiales; epidemiológicamente, en el estudio de brotes y en la vigilancia centinela, de

modo que se detectaran rápidamente cambios genéticos, antigénicos o funcionales en el virus.

La técnica de referencia definida tanto por el CDC de Atlanta como por la OMS para el diagnóstico específico, rápido y eficaz de la gripe A fue la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT/PCR) (82). Esta prueba utiliza cebadores y sondas específicos para detectar un fragmento del gen de la hemaglutinina y de la proteína M2 del nuevo virus. Esta técnica permite descartar la presencia del virus A H1N1 2009 con un alto grado de fiabilidad (98%) en los resultados negativos, siempre y cuando se realice de forma adecuada. Otras técnicas moleculares desarrolladas como alternativa a ésta, no parecen alcanzar los valores de especificidad y sensibilidad de la técnica de referencia.

La utilidad de las pruebas inmunocromatográficas de detección rápida para el diagnóstico de gripe A H1N1 2009 sigue siendo tema de debate. Por lo general son técnicas que ofrecen una buena especificidad (en torno al 90%), pero los datos de sensibilidad, cuando se comparan con la técnica de referencia, no son los deseados (entre un 12 a 67% según la casa comercial). Esta falta de sensibilidad está determinada por el valor de carga viral que puede detectarse con las técnicas inmunocromatográficas (83). Además, son pruebas que no diferencian subtipos de gripe A (84;85), por lo que su uso debe realizarse teniendo en cuenta estas limitaciones.

El diagnóstico por aislamiento en cultivo celular, aunque muy sensible y específico, no resulta práctico ya que requiere de laboratorios con capacidad para realizar este tipo de cultivos y una dotación técnica muy específica. El diagnóstico serológico tiene poca utilidad en las fases iniciales de la enfermedad, por lo que su interés se limita a estudios de vigilancia epidemiológica.

Independientemente de la técnica que se emplee para el diagnóstico, el primer factor limitante va a ser la calidad de la muestra de que se disponga. Las muestras más adecuadas son: hisopado nasofaríngeo, aspirado nasal o hisopado nasal y orofaríngeo combinado, tomado con escobillón de punta sintética (poliéster o Dacrón®) y un mango de aluminio ó plástico, e incluyendo

ambas muestras en un mismo tubo con un medio de transporte de virus. No son útiles hisopos fabricados con alginato cálcico. El lavado broncoalveolar y el esputo también son muestras aceptables y, en el caso de pacientes intubados, también puede utilizarse el aspirado endotraqueal (86). Estas últimas muestras parecen tener mayor rendimiento en pacientes con enfermedades del tracto respiratorio inferior. Existe un estudio en el que se demuestra que un 19% de pacientes con muestras positivas para gripe A H1N1 2009 tomadas de lavadobroncoalveolar, tienen resultados negativos en muestras recogidas del tracto respiratorio superior (87).

En cualquier caso, la muestra debe recogerse las primeras 48 horas tras el inicio del proceso y puede conservarse 48 horas a 4°C o a -70°C si se demora la realización de la prueba.

### **3.13 Tratamiento**

El virus de la gripe A H1N1 se caracteriza por ser resistente a amantadina y rimantadina pero sensible a los inhibidores de la neuraminidasa como oseltamivir (Tamiflu®) y zanamivir (Relenza®), aunque también se han descrito cepas resistentes a estos dos últimos fármacos. Una mutación en la neuraminidasa viral confiere altos niveles de resistencia a oseltamivir pero no a zanamivir (38;88). La mayoría de las cepas resistentes aparecieron esporádicamente en pacientes tratados, especialmente en inmunocomprometidos que recibieron tratamiento prolongado con oseltamivir o en personas en los que falló la quimioprofilaxis con este fármaco (88-92). Aún así se han encontrado cepas resistentes a oseltamivir en pacientes sin contacto previo conocido al fármaco dentro de grupos reducidos de personas sanas que se transmitieron el virus de unos a otros (88;93). Aunque la mayoría de las infecciones provocadas por estas cepas resistentes han sido autolimitadas y leves, se han constatado casos en los que han sido las causantes de neumonías en niños y han provocado casos graves e incluso la muerte en pacientes inmunocomprometidos (88;91).

En base a la experiencia de los primeros meses de pandemia, se aconseja tratamiento sintomático para casos leves de personas sin factores de riesgo. En pacientes con factores de riesgo asociados, incluyendo

embarazadas, pacientes con infección demostrada o probable, y en pacientes con desarrollo rápido y progresivo de la enfermedad, es conveniente el tratamiento con oseltamivir (75 mg/12 horas vía oral) o zanamivir (2 inhalaciones de 5 mg cada 12 horas) tan pronto como sea posible. En pacientes inmunocomprometidos y con una mala evolución del cuadro clínico, se debe valorar la administración de dosis más elevadas y durante un periodo más largo que el tratamiento estándar (94).

En aquellos individuos con neumonía viral primaria y evidencia de progresión clínica puede valorarse el uso en adultos de oseltamivir a dosis de 150 mg/12 horas y un incremento en la duración del tratamiento (10 días en total) (94). También se recomienda asociar tratamiento antimicrobiano frente a las habituales bacterias patógenas respiratorias en caso de no poder descartarse razonablemente infección bacteriana concomitante.

Pacientes con un desarrollo rápido a enfermedad grave sin confirmación microbiológica y pacientes graves con resultado negativo para gripe A H1N1 2009 por el método de referencia pero con un alto grado de sospecha de padecer la enfermedad, deben empezar tratamiento empírico lo antes posible con oseltamivir.

El tratamiento recomendado en embarazadas es el oseltamivir, ya que si bien no se han realizado estudios de seguridad del fármaco en ellas, hasta el momento no se han notificado efectos adversos para el feto.

En niños mayores de un año, el tratamiento con oseltamivir se debe ajustar al peso del paciente (95). En menores de un año y, dado que los datos de seguridad del fármaco que se conocen son muy limitados, no se recomienda el uso de este antiviral. No obstante, durante la fase pandémica la FDA aprobó el uso como emergencia de oseltamivir en menores de un año para tratamiento y profilaxis de gripe A H1N1 2009 (96).

El tratamiento se ha demostrado tanto más eficaz cuanto antes se comience, fundamentalmente en las 48 horas posteriores al inicio de los síntomas. De esta forma se disminuye el tiempo de ingreso y el riesgo de



progresión a enfermedad grave y muerte (52;79;97). La duración aconsejada es de 5 días.

Se puede considerar el uso de quimioprofilaxis postexposición con oseltamivir o zanamivir en pacientes con factores de riesgo elevados, trabajadores sanitarios o personas que han estado en contacto directo en menos de 48 horas con pacientes confirmados de padecer una gripe A H1N1 2009.

### **3.14 Vacuna monovalente para la gripe A (H1N1) 2009 pandémica**

El 21 de Agosto de 2009, el *CDC Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*, elaboró unas recomendaciones para el uso de la vacuna frente a la ola pandémica que se estaba produciendo en todo el mundo (37). En ellas se focalizaba el uso de la vacuna en personas con mayor riesgo de padecer complicaciones relacionadas con la gripe o personas que pudieran estar en contacto estrecho con población capaz de desarrollar una enfermedad grave. Se incluyeron 5 grupos poblacionales:

1. Mujeres embarazadas
2. Personas que convivían con niños menores de 6 meses
3. Personal sanitario
4. Personas entre 6 meses y 24 años
5. Población entre 25 y 64 años con algún factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

Debido a que, inicialmente, la comercialización de la vacuna no podría abastecer la necesidad de estos grupos prioritarios, se tuvo que establecer un orden de prioridad dentro de los mismos. Así, el 13 de Julio de ese mismo año, el *WHO's Strategic Advisory Group of Experts on Immunization* estableció unas recomendaciones de priorización ante el hecho objetivo de la falta de disponibilidad de la vacuna al principio de la pandemia. Por orden de prioridad propusieron a los trabajadores sanitarios, mujeres embarazadas, niños mayores de 6 meses con enfermedades crónicas subyacentes, población sana

entre los 15 y los 49 años, niños sanos, adultos sanos entre 50 y 64 años y finalmente personas sanas por encima de los 65 años (98). Esta normativa general se adaptó en cada país en función de la disponibilidad de la vacuna y de los datos epidemiológicos propios de cada región.

Ante la previsión de una pandemia, se prepararon y autorizaron con antelación unas vacunas llamadas “modelo”, con virus de la gripe A H5N1. Un vez que se identificó la variante del virus causante de la pandemia, las vacunas modelo se transformaron en vacunas pandémicas, y se reemplazó la cepa del virus H5N1 por la del virus A H1N1 2009. Esta estrategia se apoya en la experiencia previa de décadas con la vacuna frente a la gripe estacional en la que se ha visto que la inserción de una nueva cepa de virus en la vacuna no afectaba de forma sustancial su perfil de seguridad y eficacia (56).

Siguiendo estas directrices, la EMEA aprobó la comercialización de 3 vacunas frente a la gripe A H1N1 2009: Focetria® y Pamdenrix®, obtenidas tras cultivo en huevos embrionados, con adyuvante para potenciar su poder inmunógeno y Celvapan®, que se obtiene a partir de cultivo en células Vero. Las tres están preparadas con virus inactivados.

El CDC recomendó la administración de una única dosis de vacuna para los mayores de 9 años y de 2 dosis, separadas 4 semanas, para los comprendidos entre los 6 meses y los 9 años (37).

La pandemia provocada por este nuevo virus H1N1 durante el año 2009 y parte del 2010 ha hecho que, en las recomendaciones de la *WHO* (99), se incluya su incorporación en la composición de la vacuna frente a la gripe de la temporada 2010-2011 en el hemisferio Norte. La composición que este organismo propone es la formada por las tres cepas siguientes:

A/California/7/2009 (H1N1) –like virus

A/Perth/16/2009 (H3N2) –like virus

B/Brisbane/60/2008-like virus

### **3.15 Situación de la pandemia en la temporada gripal 2010-2011**

En el Hospital Clínico San Carlos la situación a lo largo del año siguiente a la pandemia ha cambiado radicalmente. Según los primeros datos recogidos, no solo ha descendido sensiblemente el número de muestras procesadas con respecto al año anterior (273 frente a 2111 respectivamente), sino que los picos de mayor incidencia se han producido a partir del mes de Diciembre 2010 hasta el mes de Marzo de 2011. El porcentaje de positividad también ha sido inferior al del pasado año (21% frente al 29% respectivamente). También se ha visto modificado el patrón de enfermos a los que se les realiza la prueba para la detección de gripe A H1N1 2009. En la temporada gripal reciente, la mayoría de los pacientes fueron enfermos ingresados en UCI a los que se les realizaba la prueba con objeto de observar la evolución de la enfermedad.

A día de entrega de la tesis nos encontramos a la espera de la elaboración del informe Anual de la temporada gripal en España por parte de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica para poder hacer comparaciones entre ambas temporadas, aunque la sensación general ha sido la de una menor incidencia global de casos durante esta última temporada.

## Objetivos



Las infecciones del tracto respiratorio son un importante problema socio-sanitario a nivel mundial. Dentro de ellas cobra una especial relevancia la enfermedad conocida como gripe o flu, cuya alta capacidad de transmisión y de infectividad la hacen capaz de causar año tras año epidemias en todo el mundo, provocando importantes problemas de morbi-mortalidad en pacientes de todas las razas y sexos.

La aparición en el año 2009 de una nueva cepa de gripe A subtipo H1N1 y la declaración de pandemia por parte de la Organización Mundial de la Salud, provocaron una alarma social de enorme magnitud en todo el mundo . Aún hoy existe controversia sobre si las medidas adoptadas para minimizar los efectos de la pandemia fueron exageradas o necesarias. Lo que sí parece claro es que las características clínico-epidemiológicas de esta nueva gripe han sido diferentes a las observadas en otras temporadas gripales, en las que la mayoría de los casos fueron provocados por virus de la influenza A subtipo H3N2.

Por otro lado, la aparición de nuevas técnicas diagnósticas (PCR reversa a tiempo real) ha dado un giro interesante, no solo en cuanto al diagnóstico microbiológico de esta enfermedad, sino también al abrir nuevos campos de investigación que permitan conocer el comportamiento del virus dentro del organismo y de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad. En este sentido, el conocimiento de la carga viral puede resultar, como ocurre con otras enfermedades víricas, un factor importante a tener en cuenta para llevar a cabo un mejor seguimiento de la enfermedad.

Por todo ello, con este estudio sugerimos la siguiente hipótesis e intentamos dar respuesta a los objetivos posteriores:

Hipótesis general: “Existen, dentro de la población general, grupos con diversos factores que les predisponen a sufrir una infección grave por gripe A H1N1 2009 y en los que la carga viral debe comportarse de forma diferente a como lo hace en los pacientes que desarrollan formas leves de enfermedad”.

### **Objetivos principales**

1. Determinar factores clínico-epidemiológicos predisponentes para padecer una infección por gripe A H1N1 2009 en los pacientes adscritos al área de influenza del Hospital Clínico San Carlos.
2. Calcular las cargas virales de las muestras respiratorias de los pacientes con gripe A H1N1 2009, y establecer los factores que pueden modificarlas.
3. Relacionar los valores de carga viral obtenidos con el curso de la enfermedad en la población de estudio.
4. Analizar los factores que predisponen a los pacientes diagnosticados de padecer una gripe A H1N1 2009 para desarrollar enfermedad grave (medida ésta como neumonía).
5. Evaluar la utilidad de distintas técnicas diagnósticas frente a la técnica de referencia.

### **Objetivos secundarios**

1. Describir el manejo microbiológico de las muestras respiratorias procesadas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos.
2. Determinar la aparición de otros patógenos (bacterias y virus respiratorios) causantes de cuadros clínicos similares a los producidos por el virus de la gripe A H1N1 2009.
3. Analizar las coinfecciones, tanto víricas como bacterianas, aparecidas en pacientes diagnosticados de gripe A H1N1 2009, desde el punto de vista clínico-epidemiológico.

# **Materiales y Métodos**





## **1. Procesamiento de muestras**

### **1.1 Recepción y procesamiento de las muestras**

Desde Junio del 2009 hasta Febrero de 2010 se recibieron en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid un total de 2150 muestras respiratorias de diferente tipo (exudados nasofaríngeos, exudados nasales, exudados faríngeos, broncoaspirados y lavados broncoalveolares), procedentes de distintos Servicios de nuestro Hospital y de diversos Hospitales de la Comunidad de Madrid. Todas ellas fueron obtenidas de pacientes con sospecha de infección por virus de la gripe A H1N1 2009 de todas las edades y sexos.

La obtención de la muestra (100), su procesamiento hasta el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos (101;102) y su conservación se realizó según recomendaciones aportadas en los protocolos de la Comunidad de Madrid. Aquellas muestras que no cumplían estos requisitos fueron excluidas del análisis.

Todas las muestras se recibieron en envases para recogida y mantenimiento de virus (envases COPAN). Una vez recepcionadas y, tras agitar enérgicamente en vortex para separar las células adheridas a la torunda, se hicieron tres alícuotas de 1 ml cada una. Una de estas alícuotas se procesó inmediatamente para la determinación de gripe pandémica y las otras dos se conservaron a -70°C para posteriores análisis.

### **1.2 Centros colaboradores**

El Hospital Clínico San Carlos formó parte de la Red de Laboratorios de Gripe de la Comunidad de Madrid durante la fase pandémica en España. Fue designado Hospital de Referencia de las Áreas Sanitarias 7 y 8 para la realización diaria de los ensayos de detección del virus para todas aquellas muestras recibidas desde cualquiera de los hospitales pertenecientes a las áreas sanitarias mencionadas. Como integrante de la Red de Laboratorios de Gripe también estaba incluido en el calendario de guardias de fines de semana y festivos, lo que implicaba la realización de la prueba para todas las muestras de todos los Centros Sanitarios de la Comunidad de Madrid durante esos días.

Las muestras que se procesaron a diario pertenecían, mayoritariamente, a la Fundación Jiménez Díaz, Hospital Fundación de Alcorcón, Hospital de Móstoles, Clínica La Milagrosa, Hospital de Madrid y durante el mes de Junio de 2009 diversos centros de Salud pertenecientes al área 7 de Madrid. Durante las guardias de fin de semana se recibieron muestras de hasta 33 hospitales públicos y privados de la Comunidad de Madrid.

## **2. Recogida datos epidemiológicos**

La recogida de los datos clínico-epidemiológicos se llevó a cabo en dos pasos:

- En primer lugar se recogieron los datos aportados por los médicos solicitantes de la prueba de detección de gripe A H1N1 2009, en los volantes remitidos con las muestras clínicas durante la fase de recepción de las mismas.
- Una vez concluída la fase pandémica, se llevó a cabo una revisión pormenorizada de las historias clínicas disponibles de cada paciente.

## **3. Definición de variables**

La definición de caso fue la adoptada por la Comunidad de Madrid en su documento de “Plan y Preparación de Respuesta ante una Pandemia de Gripe de la Comunidad de Madrid” en Mayo del año 2009 (102). Esta definición fue modificada en otro documento el 17 de Septiembre de 2009 (103).

La definición de las diferentes variables de enfermedad, sintomatología o antecedente personal fueron las adoptadas por cada médico responsable de la elaboración de las historias clínicas y de los volantes de solicitud de la prueba.

En inmunosupresión incluimos aquellos pacientes que estaban en tratamiento con corticoides y/o tratamiento con quimioterápicos y/o padecían VIH/SIDA y/u otros eventos de inmunosupresión como estar sometidos a trasplante de órgano sólido.

Las enfermedades crónicas de pulmón incluyeron pacientes con asma y/o EPOC y/o bronquiectasias y/o una miscelánea con el resto de patologías.

Agrupamos bajo el nombre de comorbilidades mayores aquellas que se encontraban en pacientes con las siguientes patologías: insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y/o enfermedad cerebrovascular y/o enfermedad hepática y/o tumor sistémico e inmunosupresión.

El cáncer agrupó a aquellos pacientes que padecían cáncer sólido metastásico o con alguna variedad de tumor hematológico.

Como enfermedades cardíacas se incluyeron la isquemia coronaria y/o ICC y/o valvulopatía y/o fallo congénito.

Bajo el nombre de enfermedades neurológicas se agruparon la enfermedad cerebrovascular y/o convulsiones y/o parálisis cerebral.

El valor de las cargas virales se midió en copias del virus por mililitro de muestra (cop/ml). El análisis cualitativo de las mismas se realizó distribuyendo el total de las muestras, en primera instancia, en tres terciles de carga viral (<2000 cop/ml, 2000-110000 cop/ml y >110000 cop/ml). Posteriormente, para la obtención de unos resultados con mayor relevancia estadística, se dividieron en dos terciles de carga viral (<2000 cop/ml y ≥2000 cop/ml). Se consideraron cargas virales bajas aquellas por debajo de 2000 cop/ml, mientras a las superiores de 2000 cop/ml se las consideró medio-altas.

#### **4. Extracción de ácidos nucleicos**

Se utilizaron 250 µl de cada muestra como volumen de partida. El ARN se extrajo en el sistema automático *EasyMag®* de *Biomerieux*, (*L'Etoile, France*) siguiendo las instrucciones del fabricante y con un proceso de lisis externa. El proceso de lisis se realizó en una campana de nivel de seguridad 2 manteniendo todas las recomendaciones de seguridad para el manejo de muestras de riesgo biológico. El volumen de elución fue de 25 µl. Una vez finalizada la extracción se procedió a la detección de gripe A mediante PCR a tiempo real. El ácido nucleico restante (15 µl) se congeló a -70°C para posteriores determinaciones. Las muestras sólo se descongelaron una vez para evitar la pérdida de viabilidad del virus.

## 5. Técnicas diagnósticas

### 5.1 PCR a tiempo real (RT-PCR)

La PCR a tiempo real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y quenchers. Ambos factores, nos van a permitir monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación

De las 2150 muestras recibidas, se realizó PCR a tiempo real a 2111. Las 39 restantes no se procesaron por no haber sido remitidas en las condiciones adecuadas.

La determinación se llevó a cabo usando los kits comerciales de Roche (*Roche Diagnostics. Mannheim. Alemania*) *RealTime Ready Influenza A/H1N1 detection set* y *RealTime Ready RNA Virus Master* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se amplificaron y detectaron tres fragmentos distintos: uno para determinar la presencia del gen de la proteína de matriz M2, genérico para gripe A, otro para el gen de la hemaglutinina H1 específico de la gripe A pandémica H1N1 2009 y el último para el control interno.

#### 5.1.1 Procedimiento

##### 5.1.1.1 Reactivos

A: *RealTime Ready Influenza A/H1N1 detection set*. Contiene:

- Primer/sonda para gen M2: 1vial liofilizado que contiene 1 nmol de primers específicos y 0,5 nmol de sonda marcada con sustancia fluorescente (FAM). Debe disolverse en 300 µl de Tris-HCl para alcanzar una concentración final de 3,33 µM para los primers y 1,67 µM para las sondas.

- Control para gen M2: 1 vial liofilizado que contiene  $8 \times 10^5$  copias del gen M2.

- Primer/sonda para el control interno: 1 vial liofilizado que contiene 1 nmol de primers y 0,5 nmol de sonda marcada con fluoróforo (*LightCycler® Yellow*) como control de extracción. Debe disolverse en 300 µl de Tris-HCl para una concentración final de 3,33 µM para los primers y 1,67 µM para las sondas.

- Primer/sonda para gen H1: 1 vial liofilizado que contiene 1 nmol de primers específicos y 0,5 nmol de sonda marcada con FAM. Debe disolverse en 300 µl de Tris-HCl para una concentración final de 3,33 µM para los primers y 1,67 µM para las sondas.

- Control para gen H1: 1 vial liofilizado que contiene  $8 \times 10^5$  copias del gen H1.

B: *RealTime Ready RNA Virus Master*. Incluye:

- Mezcla de enzimas (50x): 1 vial de 40 µl que contiene transcriptasa inversa para la síntesis de ADNc y Taq ADN polimerasa para la amplificación de las dianas de interés.

- Buffer de reacción (5x): 1 vial de 400 µl que contiene buffer de reacción para RT-PCR, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dUTP) y  $MgCl_2$ .

#### 5.1.1.2 Mezcla de reacción

En todas las muestras se llevó a cabo la detección del gen M2 y del gen H1 simultáneamente, por lo que en todos los ensayos se incluyeron controles positivos y negativos para ambos genes.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. El volumen de los distintos componentes de la mezcla de reacción fue:

<b>Mezcla de enzimas</b>	0,4 µl	0,4 µl
<b>Buffer de reacción 5X</b>	4 µl	4 µl
<b>Primer/sonda gen M2</b>	3 µl	
<b>Primer/sonda control de extracción</b>	3 µl	
<b>Primer sonda gen H1</b>		3 µl
<b>Agua para PCR</b>	4,6 µl	7,6 µl
<b>Muestra extraída a determinar ó control positivo ó control negativo</b>	5 µl	5 µl
<b>Volumen final</b>	20 µl	20 µl

### 5.1.1.3 Amplificación

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador *Stratagene® Mx3000* de *Biomerieux (L'Etoile, France)*

Se utilizaron las siguientes condiciones:

<b>1 ciclo</b>	55°C, 30 minutos	Reversotranscripción. Síntesis de ADNc
<b>1 ciclo</b>	95°C, 5 minutos	Inactivación de transcriptasa inversa y activación de polimerasa
<b>45 ciclos</b>	95°C, 30 segundos 60°C, 1 minuto	Amplificación y detección de dianas

### 5.1.2.4 Detección

Una vez transcurrida la amplificación se analizaron los datos utilizando el software del equipo.

El parámetro fundamental en una PCR a tiempo real y en función del cual se van a realizar todos los cálculos analíticos y obtención de resultados, es el denominado Ciclo Umbral (*Threshold Cycle* o *Ct*), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo. El software del *Stratagene* define el *Ct* como el ciclo en el que la fluorescencia es 10 veces superior al ruido de fondo.

La amplificación se consideró positiva cuando el *Ct* era inferior a 40 ciclos.

Los criterios de positividad o negatividad para las muestras se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Criterios de positividad/negatividad para las muestras detectadas por PCR a tiempo real.

	Positivo para gripe A	Positivo para gripe A H1N1 2009	Negativo para ambos	Fallo en procesamiento
Control positivo M2	Detectable	Detectable	Detectable	No detectable
Control positivo H1	Detectable	Detectable	Detectable	No detectable
Control negativo	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable
Detección H1	No detectable	Detectable	No detectable	Detectable
Detección M2	Detectable	Detectable	No detectable	Detectable
Control extracción	Detectable	Detectable	Detectable	No detectable

M2: gen de matriz virus gripe A genérico; H1: gen de hemaglutinina virus gripe A H1N1 2009

### 5.1.2 Cálculo de las cargas virales. Curvas patrón.

Con objeto de determinar la sensibilidad de los ensayos y poder realizar posteriormente el cálculo de las cargas virales, se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de los plásmidos controles incluidos en el *RealTime Ready Influenza A/H1N1 detection set*.

El control liofilizado ( $8 \times 10^5$  copias del plásmido control) se resuspendió en 40 µl de agua destilada. A partir de esta dilución inicial se prepararon las diluciones seriadas llevando 4 µl de la solución madre a 36 µl de agua. Se prepararon 7 diluciones de cada uno de los controles para realizar los ensayos.

La sensibilidad de la técnica se determinó analizando cuatro replicados de cada dilución en 5 ensayos independientes. El valor de Ct de cada dilución se calculó como la media de todas las medidas realizadas para esa dilución. Las curvas patrón se elaboraron representando cada valor de ciclo umbral obtenido frente al logaritmo del número de copias de ARN control presente en la dilución ensayada.

La carga viral de cada muestra clínica se obtuvo extrapolando el valor de Ct obtenido en el ensayo frente a la curva control correspondiente.



Con objeto de minimizar las variaciones entre ensayos, se incluyó un punto de la curva patrón en cada una de las determinaciones realizadas. Esta dilución se amplificó en paralelo con los genes M2 y H1 de las muestras.

El cálculo de la carga viral (en copias/ml) se obtuvo, inicialmente, a partir de la curva obtenida para el gen H1 dado que fue este ensayo el que presentó mayor sensibilidad. La extrapolación en la curva M2 se utilizó para comprobar los resultados obtenidos.

Los cálculos se realizaron aplicando la ecuación correspondiente y considerando todas las diluciones que se habían realizado durante el proceso de extracción/amplificación. El valor en copias/ml se obtuvo de la manera siguiente:

1. Se extrapoló en la ecuación del gen H1, los valores de Ct obtenidos en las gráficas y se calculó el log de la concentración. Aplicamos el antilogaritmo para obtener el número de copias totales cargadas en la reacción de PCR.
2. Las copias calculadas son las que hay en 5  $\mu$ l de eluido, los utilizados por cada muestra para la mezcla de reacción.
3. El volumen de partida para la extracción de ácidos nucleicos era de 250  $\mu$ l. Las copias totales presentes en este volumen de partida se eluyeron en 25  $\mu$ l, por lo tanto, el número de copias presente en este eluido debe ser el mismo que el número de copias de la muestra inicial. Si multiplicamos el número de copias calculado con la ecuación de la curva patrón (copias/5  $\mu$ l) por 5 obtenemos el número de copias en los 25  $\mu$ l de eluido. Estas copias son las mismas que las que hay en 250  $\mu$ l ya que hemos extraído todas las copias en el proceso de extracción.
4. Una vez conocido el número de copias en 250  $\mu$ l se multiplica el valor obtenido por cuatro para calcular el número de copias por mililitro.
5. Por tanto, para calcular el número de copias/ml de cada muestra se multiplica el valor obtenido después de extrapolar en la curva patrón y

aplicar el antilogaritmo por 20 (por 5 para calcular el número de copias en 250 µl y por 4 para calcular el valor final en 1 ml).

## **5.2 Detección de gripe A H1N1 2009 por microarrays.**

Setenta y nueve muestras previamente analizadas por PCR a tiempo real se estudiaron mediante microarrays comerciales de baja densidad, (CLART® *Fluavir*. Genómica. Coslada. España). Las muestras incluidas pertenecían a pacientes de ambos sexos (35 mujeres y 44 varones) y abarcaban un amplio rango de edades (8 meses a 85 años). Las muestras se recogieron mayoritariamente en el último trimestre del año 2009.

Esta técnica está basada en la amplificación de un fragmento específico del genoma del virus de la gripe A, seguida de la posterior detección mediante hibridación con sondas de captura dispuestas en un array.

Es capaz de detectar y caracterizar la presencia del subtipo H1N1 2009 de la nueva gripe A, y de diferenciarlo de los subtipos H1N1 y H3N2 estacionales.

La detección de los virus se lleva a cabo mediante la amplificación por PCR reversa de un fragmento específico del genoma vírico. En el caso de la nueva gripe A H1N1 2009, el fragmento amplificado es de 229 pares de bases (pb), mientras que en el caso de la gripe A estacional, es de 261 pb. El sistema de detección se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del microarray en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas.

Se seleccionaron 36 muestras positivas y 43 negativas por PCR a tiempo real para la realización de este estudio. Las muestras positivas presentaban un rango de carga viral de 0,67 a  $1,3 \times 10^8$  cop/ml.

### **5.2.1 Procedimiento**

El proceso se realizó con los reactivos incluidos en el kit y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.2.1.1 Reactivos**

- Tubos de Amplificación: Listos para la amplificación del subtipo A H1N1 2009, además de los virus influenza A H1N1 y H3N2 estacionales. Contienen

43 µL de mezcla de reacción. Hay que añadir la mezcla de enzima antes de introducir el material genético extraído.

- Mezcla de enzimas: es una mezcla de las enzimas retrotranscriptasa (RT) y ADN Polimerasa.

- Tiras *Array Strip*, incluye 8 pocillos con sondas específicas para los subtipos virales de interés.

- Solución de Hibridación.

- Diluyente de Conjugado.

- Conjugado.

- Solución de Revelado.

- Tampón de Lavado.

#### 5.2.1.2 Amplificación y visualización

Los procesos de amplificación y visualización se realizaron siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Se utilizaron 2 µl de la mezcla de enzima y 5 µl del ácido nucleico extraído en el sistema automático *EasyMag* (punto 4 de Materiales y Métodos). El proceso de amplificación se realizó en el *termocicler GeneAmp PCR System 9700 de Applied* con las siguientes condiciones:

<b>1 ciclo</b>	45°C, 45 min
	95°C, 5 min
<b>45 ciclos</b>	95°C, 0,5 min
	50°C, 1,5 min
	68°C, 1 min
<b>1 ciclo</b>	68°C, 10 min

Tras la amplificación se procedió a la hibridación y visualización de los productos amplificados. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Desnaturalización: incubar a 95 °C durante 8 min. Sacar los tubos y colocarlos inmediatamente en hielo.

2. Prelavado de los AS: este lavado se realiza mientras se desnaturalizan los amplificados y la solución de lavado se mantiene en la tira hasta la adición de los mismos.

3. Hibridación: utilizar 100 µl de solución de hibridación atemperada por cada pocillo. Añadir al mismo pocillo 4 µl del amplificado. Incubar 1 hora a 53° C, agitando a 550 rpm.

4. Doble lavado

5. Bloqueo y conjugado: añadir a cada pocillo 100 µl de la solución de conjugado. Incubar durante 15 minutos a 30° C, agitando a 550 rpm. Tras esta incubación se desecha la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío.

6. Triple lavado

7. Revelado: añadir 100 µl de solución de revelado a cada pocillo e incubar 10 minutos a 25 °C sin agitación.

8. Desechar la solución de revelado completamente con pipeta o vacío. El array debe quedar seco antes de proceder a su lectura.

9. Lectura: se realiza en el CAR (*Clinical Array Reader*) y los resultados se interpretan utilizando el software del equipo.

### **5.3 PCR clásica para detección de gripe A H1N1 2009**

Diez muestras, 8 de ellas positivas por la técnica de RT-PCR a tiempo real y dos negativas, se analizaron por PCR convencional y posterior hibridación en tira (*Speed Oligo®. Inverness Medical*). Las muestras positivas se seleccionaron dentro de un rango de cargas virales comprendidas entre 79,8 y  $5,5 \times 10^6$  cop/ml, de manera que se pudieran determinar los límites de detección respecto de la técnica de referencia.

El método *Speed Oligo®* se basa en la amplificación de un fragmento específico de un gen del virus de la gripe A H1N1 2009. Está basado en una técnica de PCR acoplada a un test rápido para la detección de la variante pandémica de la gripe A. Posee un control interno de amplificación para comprobar la ausencia de inhibidores de la amplificación en la muestra y la correcta amplificación.

#### **5.3.1 Procedimiento**

El análisis se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y con los reactivos suministrados por la casa comercial.

##### **5.3.1.1 Reactivos**

- *Master Mix* para determinación de gripe A H1N1 2009: contiene  $MgCl_2$ , oligonucleótidos específicos, desoxinucleótidos, Taq polimerasa y fragmento de

ADN para control de amplificación junto con oligonucleótidos específicos para su amplificación.

- Control positivo gripe A H1N1 2009.
- Control negativo.
- Tiras para la detección de ADN específico.
- Solución reconstituyente para *Master Mix*.
- Solución reconstituyente para control positivo.
- Solución de elución: contiene solución de hibridación.

#### 5.3.1.2 Amplificación y detección

La técnica tiene lugar en 4 etapas: extracción de ARN, retrotranscripción, amplificación con una pareja de oligonucleótidos específicos y detección por hibridación en tira.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó según protocolo expuesto en el punto 4 de Materiales y Métodos.

Se utilizaron 10µl del ácido nucleico extraído para la reacción de retrotranscripción. Ésta se realizó según protocolo proporcionado por Roche® en el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*.

La amplificación se llevó a cabo utilizando 2 µl del ADNc sintetizado en el termocicler *GeneAmp PCR System 9700* de *Applied* con las siguientes condiciones:

<b>1 ciclo</b>	92°C, 1 minuto
<b>40 ciclos</b>	92°C, 20 segundos
	55°C, 20 segundos
	72°C, 20 segundos
<b>1 ciclo</b>	72°C, 1 minuto
<b>1 ciclo</b>	95°C, 1 minuto

Como paso previo a la hibridación debe realizarse una desnaturalización del producto de la PCR (1 ciclo, 95°C 1 minuto). La hibridación se lleva a cabo utilizando 5 µl del ADN desnaturalizado.

Si la hibridación no se realizara inmediatamente, los tubos de PCR pueden congelarse a -20°C.

Para la interpretación de los resultados deben tenerse en cuenta las 3 áreas de lectura que posee el test:

-Línea de control de producto, siempre debe ser positiva. Nos indica si la prueba se ha realizado correctamente.

-Línea control de amplificación, debe aparecer siempre. Indica que no ha habido inhibición de la amplificación.

-Línea test, cuya positividad indica la presencia de material genético del virus de la gripe A H1N1 2009 en la muestra de estudio.

#### 5.4 Test rápidos inmunocromatográficos

Se evaluaron 2 tests comerciales diferentes basados en pruebas rápidas inmunocromatográficas. Se utilizaron 22 de las muestras analizadas para la detección de gripe A H1N1 2009 por la técnica de RT-PCR a tiempo real, 14 positivas y 8 negativas. Las muestras positivas abarcaban un rango de cargas virales comprendido entre 16,3 y  $2,5 \times 10^6$  copias/ml, con objeto de poder estimar el límite de detección de cada una de las técnicas en estudio.

Se evaluaron los tests: *Clearview® (CV) Influenza A&B (Inverness Medical)* y *Quick Vue® (QV) Influenza A+B (Biomerieux)*.

La prueba *Clearview® Exact Influenza A & B* es un ensayo de membrana inmunocromatográfica que utiliza la tecnología de inmunoensayo tipo “sándwich” para la detección de los antígenos de los virus de la gripe A y B. La prueba consta de un dispositivo de tiras reactivas que contiene una membrana con regiones independientes con anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados de la gripe A y B, y un conjugado en color dorado que también contiene anticuerpos específicos de la gripe A y B.

*Quick Vue® (QV) Influenza A+B* es una prueba que conlleva la extracción de antígenos víricos A y B. La muestra del paciente se coloca en el tubo del reactivo de extracción, en el que las partículas de virus presentes en la muestra se disgregan, dejando expuestas las nucleoproteínas víricas internas. Después de la extracción, se introduce la tira de prueba en el tubo del reactivo de extracción, para que reaccione con las nucleoproteínas de la muestra.

Las dos técnicas se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En ambos casos se utilizó un reactivo de extracción para,

posteriormente, permitir la reacción de los antígenos del virus con los anticuerpos específicos anclados en la tira de reacción.

Los resultados de la prueba se interpretan a los 10 (*Quick Vue® Influenza A+B*) ó 15 minutos (*Clearview® Exact Influenza A & B*) a partir de la presencia o ausencia de líneas rojas o rosas en las regiones de la prueba de la gripe A o B.

La detección se observa cuando aparecen líneas coloreadas en la tira reactiva.

La interpretación de los resultados de la técnica *Clearview® Exact Influenza A & B* es la siguiente:

Gripe A positiva: Aparecen dos líneas rojas o rosas, una en la región 'A' y otra en la región de control 'C'.

Gripe B positiva: Aparecen dos líneas rojas o rosas, una en la región 'B' y otra en la región de control 'C'.

Gripe A y Gripe B positivas: Aparecen tres líneas rojas o rosas, una en la región 'A', una en la región 'B' y otra en la región de control 'C'.

Negativo: Sólo aparece una línea roja o rosa en la región de control 'C'. No aparece ninguna línea roja o rosa en las regiones de gripe A o gripe B.

No válido: No aparece ninguna línea roja o rosa en la región de control 'C' aunque esté visible una línea en las regiones 'A' o 'B'. La ausencia de la línea de control es indicativa de un error del procedimiento o de un posible deterioro del reactivo. Debe llevarse a cabo otra prueba.

En las tiras *Quick Vue® Influenza A+B* se valorará a los diez minutos, la aparición de cualquier indicio de formación de una línea de prueba de color entre rosa y rojo, por encima o por debajo de la línea de control azul, e indicará un resultado positivo y la presencia del antígeno A o B del virus de la gripe.

Si la línea roja está por encima de la línea de control, los resultados de la prueba serán positivos para el tipo A.

Si la línea roja se encuentra por debajo de la línea de control, los resultados de la prueba serán positivos para el tipo B.

A los diez minutos, la aparición únicamente de la línea azul de control del procedimiento indica que no se detectaron antígenos del virus de la gripe tipo A o B. Un resultado negativo debe comunicarse como presuntamente negativo respecto a la presencia del antígeno de la gripe.

Si al cabo de diez minutos no aparece la línea azul de control del procedimiento, aunque aparezca una línea de prueba de color rosa a rojo, el resultado no se considerará válido.

### **5.5 Detección de virus respiratorios por técnicas de Arrays**

Se utilizaron 156 de las muestras analizadas por PCR a tiempo real para analizar la presencia de otros virus respiratorios. Se seleccionaron 75 muestras positivas y 81 muestras negativas para gripe pandémica. Las muestras se seleccionaron cronológicamente (entre muestras recibidas desde Junio a Diciembre de 2011), e incluyeron pacientes de todas las edades.

Los virus respiratorios se detectaron e identificaron utilizando el kit comercial *CLART® PneumoVir 13.1* (Genómica, Coslada, España).

Esta técnica está basada en la amplificación de fragmentos específicos del genoma de los distintos virus respiratorios y la posterior detección mediante hibridación con sondas de captura específicas de cada virus.

Es capaz de detectar y caracterizar la presencia de 17 virus humanos que causan infecciones respiratorias en las muestras clínicas más comunes.

Los virus analizados son: Adenovirus; Bocavirus; Coronavirus; Enterovirus(Echovirus); Influenza virus A, B, y C; Metapneumovirus (subtipos A y B); Parainfluenza virus 1, 2, 3, y 4 (subtipos A y B); Rhinovirus; Virus Sincitial Respiratorio tipo A (VSR-A); Virus Sincitial Respiratorio tipo B (VSR-B).

La detección de los virus se lleva a cabo mediante la amplificación por PCR reversa de un fragmento específico del genoma vírico de entre 120-330



pb. La detección del fragmento amplificado se realiza gracias a una plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad.

El sistema de detección se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del array en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas. Durante la RT-PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del array, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del array en las que ocurre la hibridación.

La técnica, que debe realizarse en cuatro áreas separadas físicamente (área de extracción, área de pre-amplificación, área de carga de muestras y área post-amplificación), para evitar la contaminación, se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y con el material suministrado por el mismo. Debido al elevado número de cebadores necesarios para la amplificación de los 17 virus estudiados, se utilizaron dos tipos de tubos de amplificación:

-Tubo incoloro (multiplex-PCR 1) para la amplificación de Coronavirus;

Metapneumovirus (subtipos A y B); Parainfluenza virus 1, 2, 3 y 4 (subtipos A y B) y VRS-A.

-Tubo coloreado (multiplex-PCR 2) para la amplificación de Adenovirus;

Bocavirus; Enterovirus (Echovirus); Influenza virus A, B y C; Metapneumovirus, Rhinovirus y VRS-B.

El proceso se llevo a cabo según el siguiente esquema:

#### 1. Extracción ADN/ARN

Proceso realizado según protocolo expuesto en el punto 4 de Materiales y Métodos

## 2. Amplificación y detección

En cada amplificación se incluyó un control interno para garantizar el correcto desarrollo del ensayo.

Se añadieron 2 µl de la mezcla de enzimas (mezcla de retrotranscriptasa y ADN polimerasa) a ambos tubos de amplificación y 5 µl del ARN/ADN extraído.

Se llevaron al termociclador con las siguientes condiciones:

<b>1 ciclo</b>	45°C, 45 min
	95°C, 15 min
<b>45 ciclos</b>	95°C, 0,5 min
	50°C, 1,5 min
	68°C, 1 min
<b>1 ciclo</b>	68°C, 10 min

El proceso finalizará en unas 5 horas aproximadamente.

Una vez finalizada la amplificación, se procedió a la captura y posterior procesamiento de la imagen en el sistema CAR (*Clinical Arrays Reader*) (Figura 4).



**Figura 4.** Sistema CAR (*Clinical Arrays Reader*)

Este sistema permite la obtención y procesamiento de todos los datos del array y la elaboración de un informe con resultado para todos los virus analizados (Figuras 5 y 6).

**GEN•MICA**

**Resultados** ?

RESULTADOS <b>PneumoVir</b>		Código de análisis: 040507
Referencia del análisis:	1	
Código AT:	11861043040507	
Tipo de análisis:	tmb a punto final	
Fecha y hora:	2007-01-03 16:33	

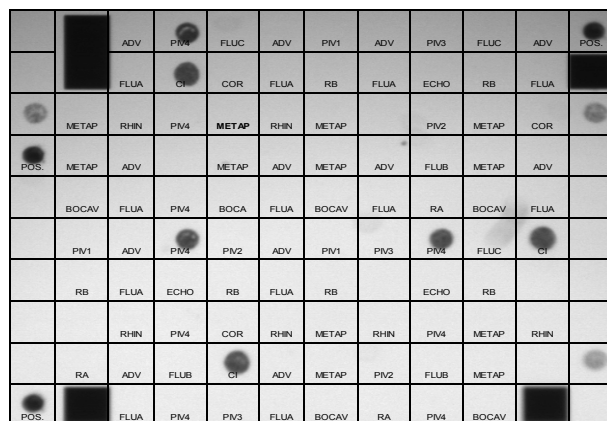
**Exportar** **Imprimir**

VIRUS		
Virus	Resultado	Controles
V.Respiratorio Sincitial A	Negativo	Conforme
V.Respiratorio Sincitial B	<b>POSITIVO</b>	Conforme
Rhinovirus	Negativo	Conforme
Influenza A	<b>POSITIVO</b>	Conforme
Influenza B	Negativo	Conforme
Influenza C	Negativo	Conforme

**Lista** **Imagen** **Datos de lectura** **Resultados**

2007-01-03 16:38:46

**Figura 5.** Informe procesado por el analizador CAR una vez leído el fondo de cada pocillo



**piv4**

**Figura 6.** Imagen observada por el analizador automático (CAR) del fondo de cada pocillo. En este caso se trata de una muestra positiva ya que tiene señal para el control interno y para el virus parainfluenza IV.

## **6. Análisis estadístico**

Las variables recogidas, debidamente etiquetadas, se introdujeron en el programa estadístico SPSS 15.0.

### **6.1 Análisis descriptivo y comparación entre los grupos de estudio**

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias y porcentaje. Las variables cuantitativas se resumirán con su media, desviación estándar (DE), e intervalo de confianza al 95%, si las variables siguieran una distribución normal. Las variables que muestran una distribución asimétrica se presentan con mediana y rango intercuartílico (P25-75).

Se ha evaluado la asociación entre variables cualitativas, con el test de Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Asimismo, se ha evaluado la asociación entre variables cualitativas en tablas de 2xn por medio de la razón de verosimilitud.

Las comparaciones de variables cuantitativas se realizaron mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney en caso de comparar dos grupos o test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos. Para todas las pruebas se ha aceptado un valor de significación del 5%.

Se ha realizado un análisis estratificado para controlar el efecto de los factores de confusión y evaluar la presencia de interacciones. Se calcularán tanto las OR crudas como las ajustadas, con sus intervalos de confianza del 95%.

### **6.2 Análisis Multivariante**

La variable dependiente principal se estudió como variable dicotómica. Se ha ajustado un modelo teórico explicativo de regresión logística para cada una de las variables neumonía, carga viral y PCR, controlando por aquellas variables que en análisis crudo mostraron una p de contraste inferior a 0,05 y/o fueron clínicamente relevantes.

Este modelo permite identificar y evaluar la relación entre un conjunto de variables explicativas y la ocurrencia de un evento (IR). Se presentan las odds ratio (OR) ajustadas junto a sus intervalos de confianza al 95%.

Para la prueba se aceptó un valor de significación del 5%. El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico v. 15.0.

## **Resultados**

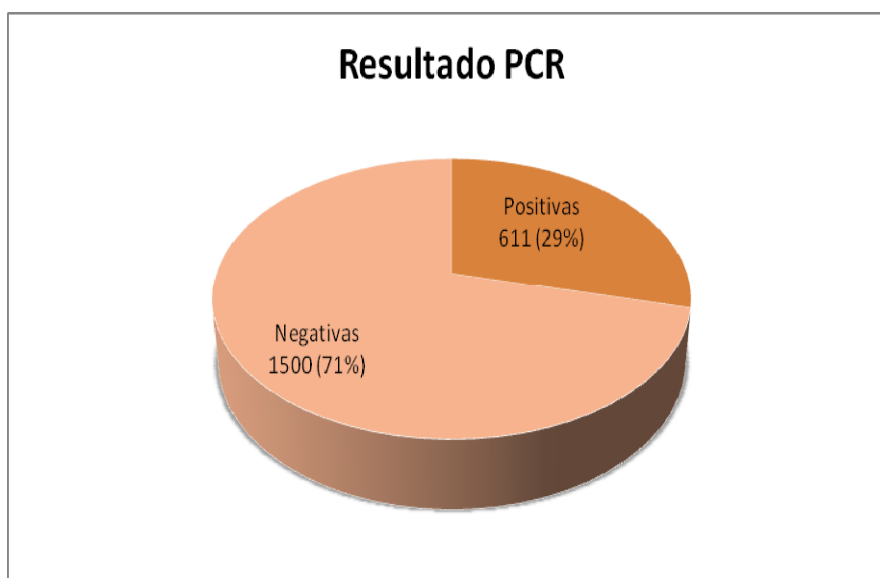


## 1. Descriptivo general

### 1.1 Datos generales

Desde el mes de Junio del año 2009 hasta el mes de Febrero del 2010 se recibieron en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico San Carlos un total de 2150 muestras respiratorias de pacientes con sospecha de padecer una infección por el virus de la gripe A H1N1 2009. De ellas, 2111 se procesaron para la determinación de gripe A H1N1 2009 por la técnica de referencia (PCR reversa a tiempo real). El resto, un total de 39 muestras, no se procesaron por no mantener las condiciones óptimas de conservación durante su transporte al laboratorio.

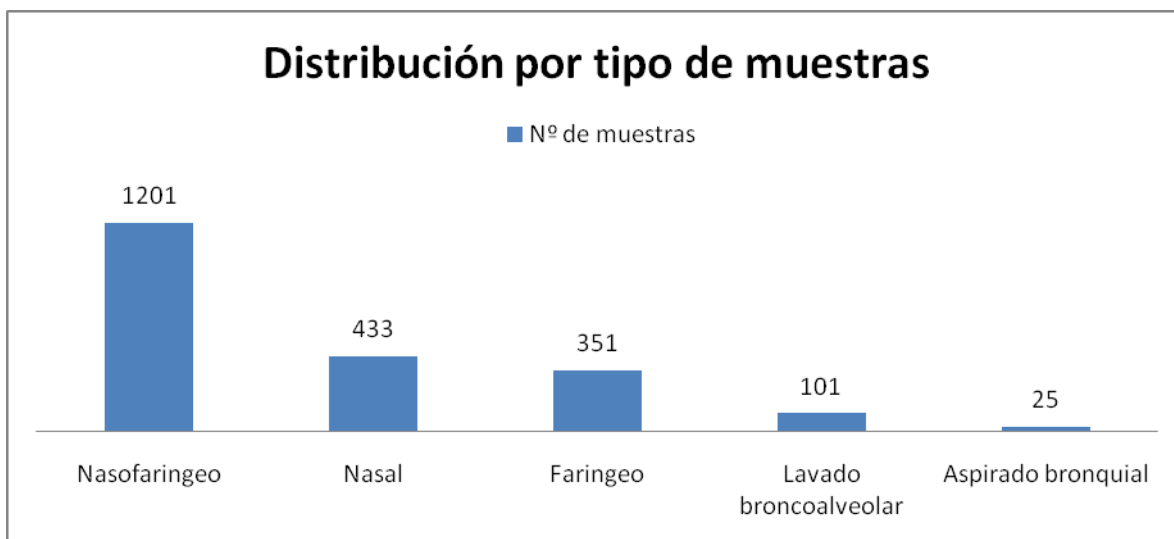
De las 2111 muestras procesadas, 611 resultaron positivas y 1500 negativas (Figura 7).



**Figura 7.** Porcentaje de muestras positivas y negativas.

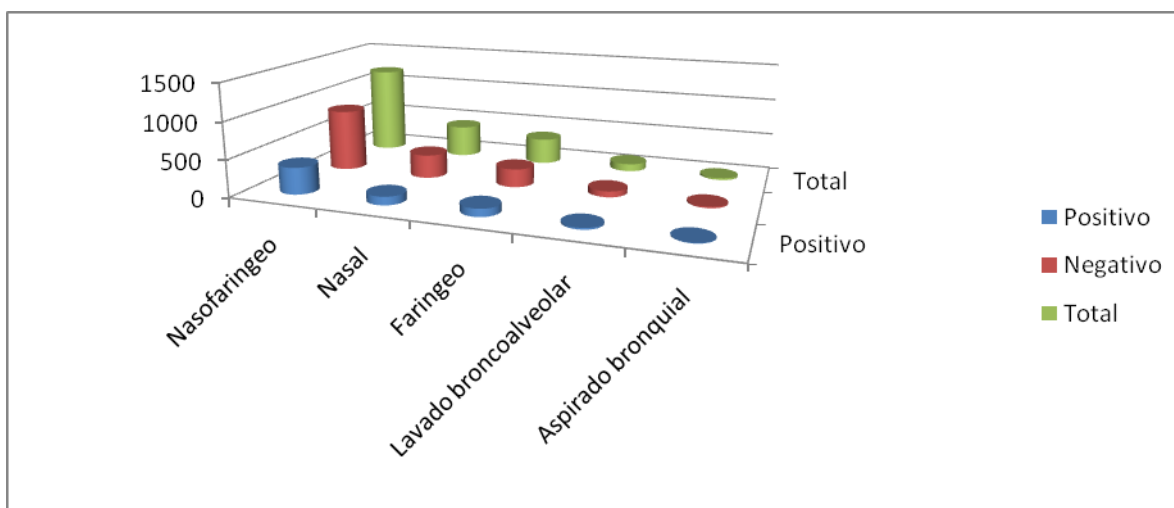
Se recibieron 5 tipos de muestras respiratorias diferentes, donde los exudados nasofaríngeos fueron las mayoritarias (56,9%). Los exudados nasales y los exudados faríngeos fueron los siguientes por orden de importancia (Figura 8).





**Figura 8.** Distribución por tipo de muestras recibidas.

También fueron los exudados nasofaríngeos las muestras con mayor número de resultados positivos, representando el 59,41% del total. El número de muestras positivas y negativas por tipo de muestra se recogen en la figura 9.

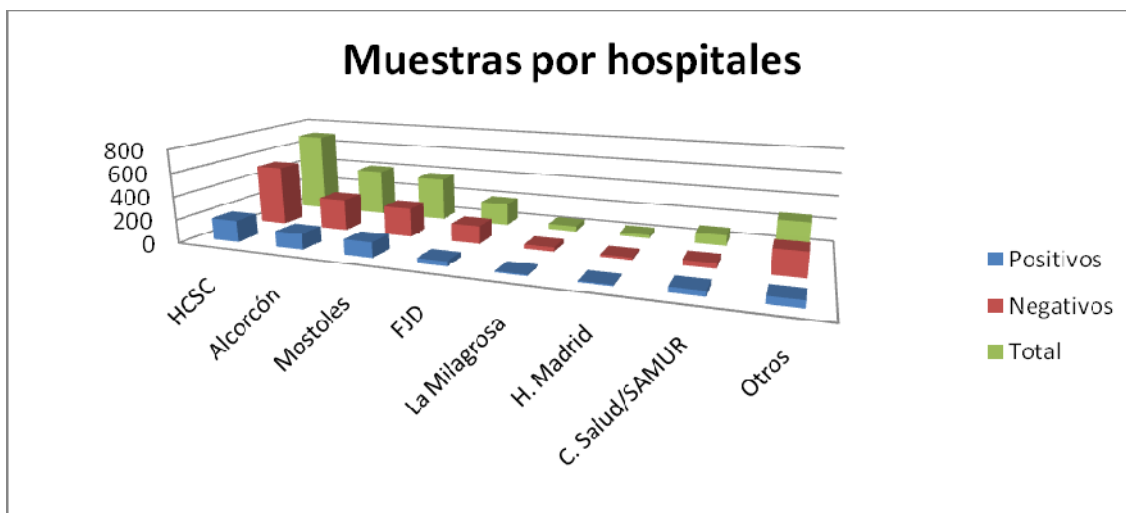


**Figura 9.** Distribución de casos por tipo de muestra.

Las muestras recibidas provenían de un amplio abanico de Hospitales de la Comunidad de Madrid, tanto públicos como privados. El Hospital Clínico San Carlos fue el Hospital del que más muestras se procesaron y en el que más positivos se obtuvieron, seguido del Hospital de Alcorcón y del Hospital de Móstoles. Cabe destacar que, durante los primeros días de pandemia, se

recibieron muestras de diversos centros de salud de Atención Primaria, y que, entre estas muestras, se detectó una alta tasa de positividad (45 positivas frente a 45 negativas).

El número de muestras positivas y negativas por hospital aparece en la figura 10.

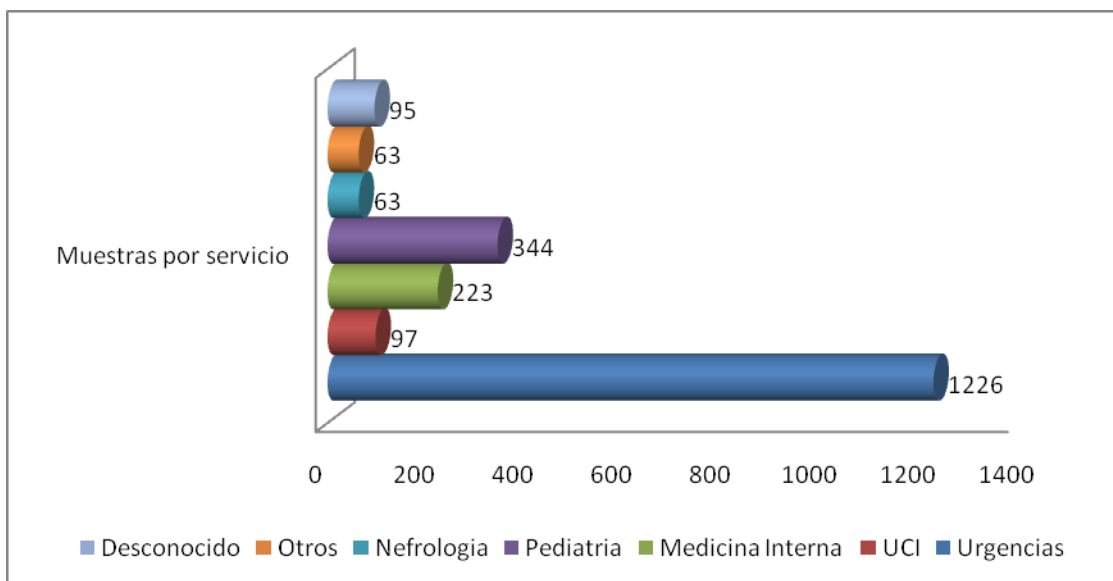


**Figura 10.** Distribución de casos por Hospitales. HCSC: Hospital Clínico San Carlos; FJD: Fundación Jiménez Díaz; C. Salud: Centros de Salud

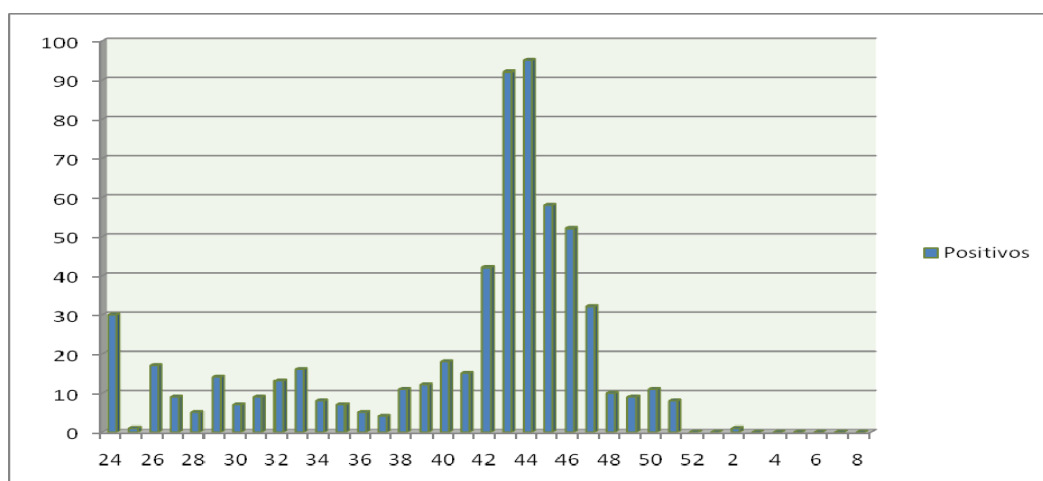
Al analizar la procedencia de las muestras por Servicios Hospitalarios, los Servicios de Urgencias aparecen como los que más muestras enviaron (58% del total de muestras recibidas) con gran diferencia respecto del resto (Figura 11).

## 1.2 Incidencia por semanas

En la semana 24 del año 2009 se empezaron a detectar casos de gripe A H1N1 2009, coincidiendo con un pico de incidencia de la enfermedad. Las semanas posteriores se mantuvieron más ó menos estables, hasta la semana 42 donde empezó a notarse un aumento significativo. Este pico se mantuvo hasta la semana 47, donde se produjo un descenso paulatino del número de casos hasta hacerse casi nulo en las primeras semanas del año 2010 (Figura 12).



**Figura 11.** Distribución de muestras por Servicios Hospitalarios.

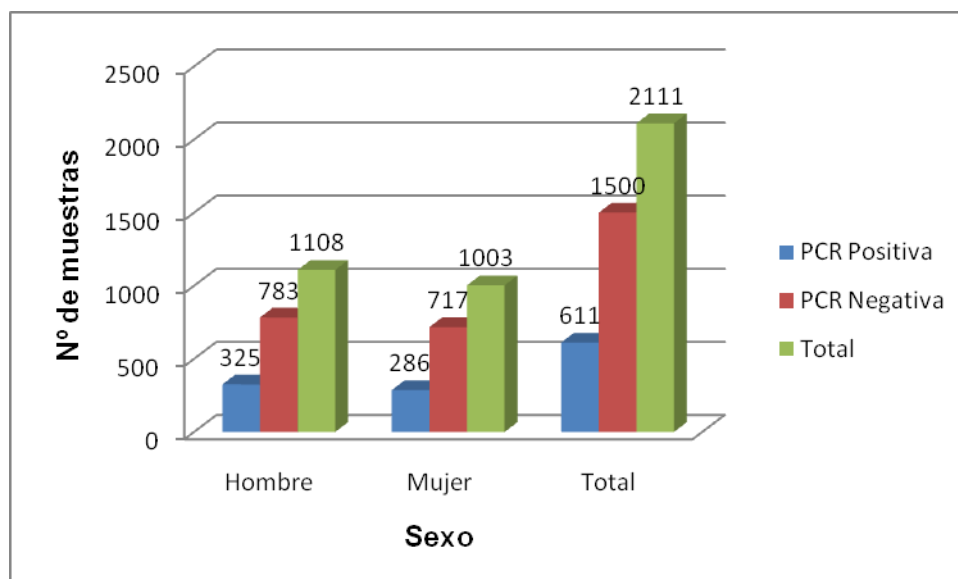


**Figura 12.** Evolución de los casos de gripe A H1N1 2009 desde el inicio de la pandemia hasta principios del año 2010.

### 1.3 Datos demográficos

El número de muestras de varones recibidas fue ligeramente superior (figura 13), sin embargo no se observaron apenas diferencias entre el porcentaje de resultados positivos y negativos para cada sexo. Así, se recibieron un total de 1108 muestras procedentes de pacientes masculinos, 325 de ellas positivas (53,2% del total de muestras positivas). Por otro lado, el número de muestras recibidas de mujeres fue de 1003, con 286 de estas

muestras positivas para gripe A H1N1 2009 (46,8% del total de muestras positivas).



**Figura 13.** Resultado de las muestras por sexo. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

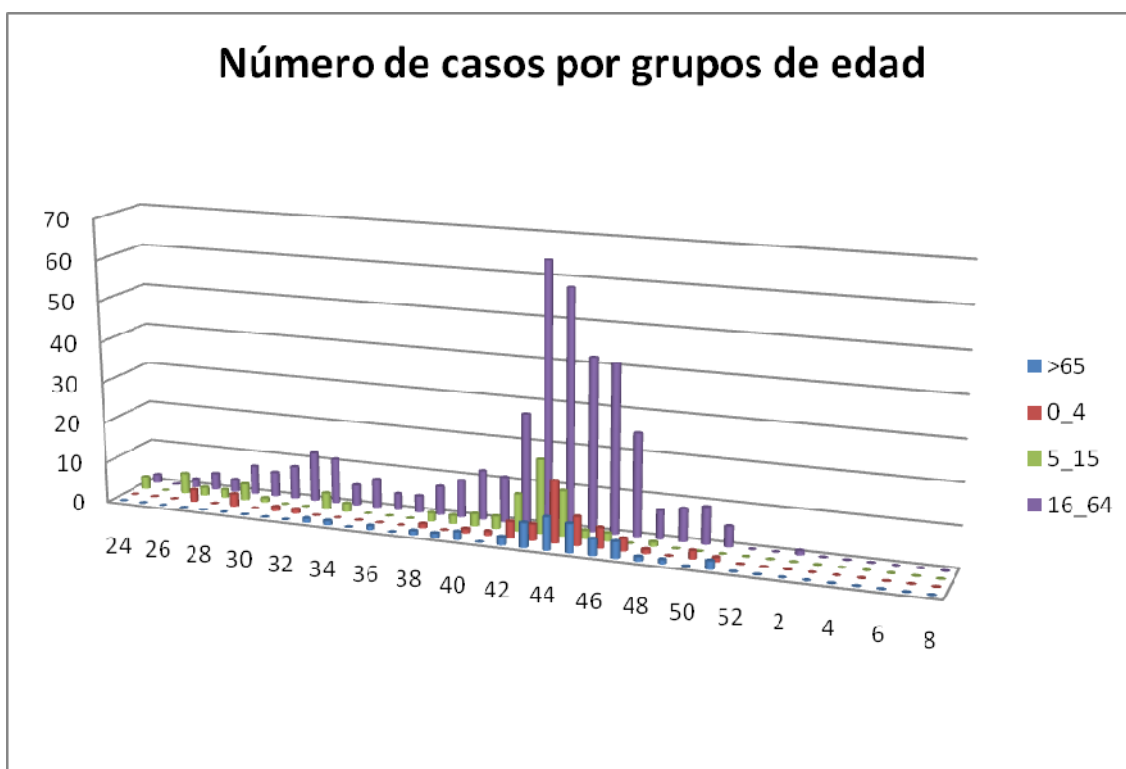
La edad media de los pacientes a los que se les realizó la prueba fue de 39,92 años (DT: 24,72), y de los que resultaron positivos y negativos de 33,11 (DT: 20,36) y 42,60 (DT: 25,75) años, respectivamente. La mediana de los pacientes positivos fue de 32 años (Percentil 25: 17; Percentil 75: 47).

El análisis por grupos de edad mostró que el grupo mayoritario, donde se produjeron más casos positivos, fue el de los pacientes con una edad comprendida entre los 16 a 64 años, concentrando el 70,1% de los casos totales. El número de casos en menores de 15 años fue de 129 y de 42 en los mayores de 65 (tabla 2).

**Tabla 2.** Distribución de casos por grupos de edad.

Rango edad	Positivo	Porcentaje (%)	Negativo	Porcentaje (%)	Total	%
0_4	53	9,3	199	13,7	252	12,4
5_15	76	13,3	69	4,7	145	7,1
16_64	401	70,1	851	58,5	1252	61,7
>65	42	7,3	337	23,1	379	18,7
Total	572	100	1456	100	2028	100

Al analizar por grupos de edad la incidencia de los casos por semana, observamos una distribución semejante al compararlo frente a la población general. Es decir, a partir de la semana 42 comenzó un pico de incidencia en todos los grupos, que se mantuvo estable hasta la semana 44-45, dónde empezó a disminuir paulatinamente hasta la semana 48. En el grupo de pacientes comprendidos entre los 16-64 años, se siguió observando un pequeño número de casos durante 4 semanas más (de la 48 a la 51), hecho que no ocurrió en el resto de grupos (Figura 14).

**Figura 14.** Distribución de casos por semana y grupos de edad.

## 1.4 Sintomatología

Los síntomas más habituales dentro de la población sospechosa de padecer gripe A H1N1 2009, fueron la fiebre y la tos, apareciendo en un 75% y 60% de los pacientes, respectivamente. En menor proporción la disnea y las mialgias, con un 27,5% y 21,8% respectivamente. La sintomatología gastrointestinal apareció mucho menos, siendo los vómitos (8,8%) la más frecuente.

Dentro de los pacientes con prueba positiva para gripe A H1N1 2009, la fiebre y la tos también fueron los dos síntomas que más frecuentemente se observaron, con porcentajes muy parecidos a los de la población general. En torno a un 23% de estos pacientes padecían mialgias y disnea. A éstos síntomas se les sumó el malestar general (21,5%). La sintomatología gastrointestinal fue poco prevalente en este grupo. Todos los síntomas estudiados y sus porcentajes de aparición pueden observarse en la tabla 3.

## 1.5 Comorbilidades o antecedentes personales

### 1.5.1 Población sospechosa de padecer gripe A H1N1 2009

El antecedente personal más común dentro del total de la población sospechosa de padecer gripe A H1N1 2009 fue la inmunosupresión (33,6% de la población conocida). El trasplante de órgano sólido, junto con los episodios de HIV/SIDA fueron los eventos mayoritarios dentro de este grupo.

La segunda comorbilidad más frecuente en estos pacientes fue la de tener antecedentes de enfermedad crónica de pulmón, que apareció en un 28,4% de los casos. El asma y los pacientes con EPOC fueron los más representativos dentro de este grupo.

Ciento cuarenta y uno de los pacientes con sospecha de gripe (25,6%) presentaban además comorbilidades mayores.

Los pacientes con cáncer representaron un 15.7% de los individuos con sospecha de gripe pandémica (86 pacientes).

**Tabla 3.** Porcentaje de aparición de diversos síntomas en la población de estudio.

Síntomas	Resultado	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Fiebre	si	618	74,6	172	77,8	446	73,5
	no	210	25,4	49	22,2	161	26,5
Tos	si	404	59,1	124	66,7	280	56,2
	no	280	40,9	62	33,3	218	43,8
Dolor garganta	si	74	13	25	17,1	49	11,6
	no	495	87	121	82,9	374	88,4
Rinorrea	si	65	11,4	23	15,6	42	9,9
	no	505	88,6	124	84,4	381	90,1
Mialgias	si	127	21,8	33	23,1	94	21,4
	no	455	78,2	110	76,9	345	78,6
Disnea	si	152	27,5	33	23,2	119	29
	no	401	72,5	109	76,8	292	71
Diarrea	si	36	6,7	10	7,3	26	6,5
	no	498	93,3	127	92,7	371	93,5
Vómitos	si	47	8,8	8	5,9	39	9,8
	no	487	91,2	128	94,1	359	90,2
Malestar general	si	79	14,8	29	21,5	50	12,6
	no	454	85,2	106	78,5	348	87,4
Cefalea	si	77	13,7	18	12,9	59	13,9
	no	486	86,3	122	87,1	364	86,1
Artralgias	si	50	9,4	18	13,3	32	8,1
	no	480	90,6	117	86,7	363	91,9

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

La insuficiencia renal crónica (IRC) estaba presente en 74 pacientes (14%), la diabetes tipo I/II en 69 (12,9%) y la hipertensión arterial en 128 individuos (24,2%). 50 mujeres estaban embarazadas (3,6% del total de la población) y 24 eran obesos (índice de masa corporal  $\geq 30$ ). Todos los datos pueden observarse en la tabla 4.

### 1.5.2 Pacientes con prueba positiva para gripe A H1N1 2009

Las enfermedades crónicas de pulmón fueron las comorbilidades mayoritarias en los pacientes diagnosticados con gripe A H1N1 2009 y dentro de estas, el asma fue el antecedente más observado. La inmunosupresión, principalmente pacientes VIH/SIDA y con trasplante de órgano sólido,

constituyó el segundo antecedente personal más frecuente. Estos datos se encuentran recogidos en la tabla 4.

**Tabla 4.** Principales comorbilidades encontradas en la población de estudio.

Comorbilidades	Resultado	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Asma	si	78	14,1	41	27,5	37	9,1
	no	477	85,9	108	72,5	369	90,9
EPOC	si	64	11,9	12	8,7	52	13
	no	474	88,1	126	91,3	348	87
Bronquiectasias	si	9	1,7	3	2,2	6	1,5
	no	518	98,3	133	97,8	385	98,5
Otra pulmonar	si	24	4,4	5	3,6	19	4,7
	no	522	95,6	134	96,4	388	95,3
Enfermedad crónica pulmón	si	167	28,4	56	35,9	111	25,8
	no	420	71,6	100	64,1	320	74,2
Corticoides	si	15	2,8	3	2,2	12	3,1
	no	512	97,2	133	97,8	379	96,9
Quimioterapia	si	36	6,8	9	6,7	27	6,9
	no	493	93,2	126	93,3	367	93,1
HIV/SIDA	si	68	12,5	17	12,2	51	12,5
	no	478	87,5	122	87,8	356	87,5
Otra inmunosupresión	si	79	14,7	19	13,8	60	15,1
	no	457	85,3	119	86,2	338	84,9
Inmunosupresión	si	188	33,6	46	32,2	142	34,1
	no	372	66,4	97	67,8	275	65,9

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana. Enfermedad crónica del pulmón incluye: Asma, EPOC, bronquiectasias y otra pulmonar. Inmunosupresión incluye corticoides, quimioterapia, HIV/SIDA y otra inmunosupresión.

Dieciséis individuos padecían cáncer, 11 algún tipo de enfermedad cardíaca y 6 enfermedad neurológica. Además, 27 personas padecían una comorbilidad mayor.



**Tabla 4 (continuación).** Principales comorbilidades encontradas en la población de estudio.

Comorbilidades	Resultado	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Enfermedad cerebrovascular	si	13	2,5	3	2,2	10	2,6
	no	514	97,5	133	97,8	381	97,4
Convulsiones	si	13	2,5	2	1,5	11	2,8
	no	515	97,5	133	98,5	382	97,2
Parálisis cerebral	si	8	1,5	1	0,7	7	1,8
	no	519	98,5	134	99,3	385	98,2
Enfermedad neurológica	si	31	5,8	6	4,4	25	6,4
	no	499	94,2	130	95,6	369	93,7
Isquemia coronaria	si	35	6,6	5	3,7	0	7,7
	no	493	93,4	131	96,3	362	92,3
ICC	si	18	3,4	3	2,2	15	3,8
	no	513	96,6	132	97,8	381	96,2
Valvulopatía	si	15	2,9	2	1,5	13	3,3
	no	511	97,1	133	98,5	378	96,7
Fallo congénito	si	9	1,7	2	1,5	7	1,8
	no	523	98,3	135	98,5	388	98,2
Enfermedad cardíaca	si	67	12,4	11	8	56	14
	no	472	87,6	127	92	345	86
Cáncer sólido metastásico	si	35	6,6	8	5,9	27	6,8
	no	497	93,4	128	94,1	369	93,2
Tumor hematológico	si	47	8,7	8	5,9	39	9,7
	no	491	91,3	128	94,1	363	90,3
Cáncer	si	86	15,7	16	11,7	66	16,2
	no	462	84,3	121	88,3	341	83,8
Comorbilidades mayores	si	141	25,6	27	19,6	114	27,7
	no	410	74,4	111	80,4	299	72,3

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva. Enfermedad neurológica incluye: enfermedad cerebrovascular, convulsiones y parálisis cerebral; Enfermedad cardíaca incluye: isquemia coronaria, ICC, valvulopatía y fallo congénito; Cáncer incluye: cáncer sólido metastásico y tumor hematológico; Comorbilidades mayores incluye: ICC, enfermedad cerebrovascular, enfermedad hepática, tumor sistémico e inmunosupresión.

Se incluyeron en el estudio 27 mujeres embarazadas (el 47,4% de las mujeres en edad fértil con prueba positiva para gripe A H1N1 2009), con una edad media de 28 años (desviación típica 5,463). En 23 pacientes se encontró algún grado de hipertensión arterial (HTA), 13 individuos con IRC y 11 con

diabetes tipo I ó II. Tan sólo hubo 4 personas obesas con un IMC  $> \text{ó } = 25$ . Estos datos pueden observarse en la tabla 4.

**Tabla 4 (continuación).** Principales comorbilidades encontradas en la población de estudio.

Comorbilidades	Resultado	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Obesidad	si	24	4,5	4	2,9	20	5,1
	no	506	95,5	132	97,1	374	94,9
HTA	si	128	24,2	23	17	105	26,6
	no	401	75,8	112	83	289	73,4
Fumador	si	62	11,8	12	8,9	50	12,8
	no	464	88,2	123	91,1	341	87,2
Diabetes tipo I/II	si	69	12,9	11	8,1	58	14,6
	no	464	87,1	125	91,9	339	85,4
VHC	si	35	6,6	7	5,2	28	7,1
	no	494	93,4	128	94,8	366	92,9
VHB	si	6	1,1	5	0,7	1	1,3
	no	520	98,9	134	99,3	386	98,7
Arritmia	si	29	5,5	4	3	25	6,4
	no	499	94,5	131	97	368	93,6
Enfermedad gastrointestinal	si	9	1,7	2	1,5	7	1,8
	no	517	98,3	133	98,5	384	98,2
IRC	si	74	14	13	9,6	61	15,5
	no	455	86	122	90,4	333	84,5
Abuso sustancias	si	28	5,3	6	4,4	22	5,6
	no	498	94,7	129	95,6	369	94,4
Enfermedad autoinmune	si	15	2,8	3	2,2	12	3,1
	no	512	97,2	132	97,8	380	96,9
Embarazo	si	50	32,5	27	47,4	23	23,8
	no	104	67,5	30	52,6	74	76,2

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; VHC: virus hepatitis C; VHB: virus hepatitis B; IRC: insuficiencia renal crónica; HTA: hipertensión arterial.

## 1.6 Complicaciones

El 43,2% de la población conocida sospechosa de padecer una gripe A H1N1 2009 había sido diagnosticada de neumonía en el momento de solicitarles la prueba de detección de la gripe A.

Se observaron también 38 casos de hipoxemia, 25 episodios de sepsis, 22 shock sépticos y 28 derrames pleurales, como eventos más significativos.

Hubo 49 casos de neumonía (30,6%) en la población positiva para la gripe A H1N1 2009. Tan sólo se dieron dos casos de sepsis en este grupo, con un síndrome de distress respiratorio agudo y 3 fracasos renales agudos. Todos los datos pueden observarse en la tabla 5.

**Tabla 5.** Principales complicaciones aparecidas en la población de estudio.

Complicaciones	Resultado	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Neumonía	si	290	43,2	49	30,6	241	47,2
	no	381	56,8	111	69,4	270	52,8
Hipoxemia	si	38	7,1	7	5,1	31	7,7
	no	501	92,9	131	94,9	370	92,3
SDRA	si	13	2,5	1	0,7	12	3,1
	no	513	97,5	134	99,3	379	96,9
Neumonía 2ª	si	0	0	0	0	0	0
	no	526	100	135	100	391	100
Shock	si	22	4,2	1	0,7	21	5,4
	no	505	95,8	134	99,3	371	94,6
Sepsis	si	25	4,7	2	1,5	23	5,8
	no	505	95,3	134	98,5	371	94,2
Alteración función hepática	si	11	2,1	2	1,5	9	2,3
	no	517	97,9	134	98,5	383	97,7
Fracaso renal agudo	si	18	3,4	3	2,2	15	3,8
	no	511	96,6	132	97,8	379	96,2
Alteraciones cardíacas	si	6	1,1	1	0,7	5	1,3
	no	523	98,9	134	99,3	389	98,7
CID	si	3	0,6	0	0	3	0,8
	no	526	99,4	135	100	391	99,2
Derrame pleural	si	28	5,3	0	0	28	7,1
	no	503	94,7	135	100	368	92,9
Neumotórax	si	8	1,5	1	0,7	7	1,8
	no	522	98,5	135	99,3	387	98,2

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo; CID: coagulación intravascular diseminada.

## 1.7 Ingresos

El 47% de los pacientes conocidos con sospecha de padecer gripe A H1N1 2009 necesitaron ingreso hospitalario. El 6,4% requirieron hospitalización en el Servicio de Cuidados Intensivos y 24 de ellos fallecieron. Dentro de los pacientes con resultado positivo para gripe A H1N1 2009, el 38,7% necesitó

hospitalización, solo un 2,2% lo hizo en UCI y sólo se registraron 2 muertes (tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de personas ingresadas y exitus en la población de estudio.

	SI/NO	Total	Porcentaje (%)	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)
Ingreso	si	328	47	72	38,7	256	49,9
	no	371	53	114	61,3	257	50,1
Ingreso UCI	si	45	6,4	4	2,2	41	8
	no	654	93,6	182	97,8	472	92
Exitus	si	24	3,4	2	1,1	22	4,3
	no	675	96,6	184	98,9	491	95,7

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

## 1.8 Infecciones y coinfecciones bacterianas y fúngicas

Se analizó el número de pacientes que podían padecer otra infección simultáneamente a la gripe A, y cuántos de los que se sospechaba que tenían gripe, estaban en realidad, infectados por otro microorganismo. Se encontraron 82 pacientes con alguna prueba microbiológica positiva para algún microorganismo; de estos, 10 pacientes (5,4%) estaban infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009, siendo los 72 pacientes restantes negativos para esta determinación.

### 1.8.1 Pacientes con prueba positiva para gripe A H1N1 2009

Se obtuvieron 12 pruebas positivas para algún microorganismo en los 10 pacientes que presentaron coinfección; dos de ellos tuvieron dos aislamientos distintos (un paciente con *P. jirovecchi* y *S. pneumoniae* en un lavadobroncoalveolar, y en otro se aisló un *S. pneumoniae* en broncoaspirado y un *E. coli* en orina). De estos 10 pacientes, 5 estaban ingresados (o necesitaron ingreso), 4 de ellos por neumonía. Los ingresos se produjeron en UCI (3 pacientes: 1 paciente con hemocultivo positivo para *S. pyogenes*, 1 paciente con esputo positivo para *A. baumannii* y uno de los pacientes con doble coinfección por *S. pneumoniae* en esputo y *E. coli* en orina). El otro paciente con cuadro de neumonía fue ingresado en planta de medicina interna y fue el doble coinfectado por *P. jirovecchi* y *S. pneumoniae*.

Un paciente fue ingresado sin diagnóstico de neumonía con una *E. coli* en un hemocultivo.

Finalmente a 3 pacientes se les detectó un microorganismo pero no fueron ingresados ni tuvieron sospecha de neumonía. Correspondieron a 2 pacientes con resultado en hemocultivo positivo para *Streptococcus* grupo *viridans* y un paciente con antígeno de neumococo en orina positivo.

El microorganismo que se aisló con más frecuencia fue *S. pneumoniae* (4 ocasiones), seguido de *E.coli* y *Streptococcus* grupo *viridans* (2 veces cada uno). Los microorganismos encontrados pueden observarse en la tabla 7.

**Tabla 7.** Microorganismos detectados en pacientes con gripe A H1N1 2009.

Microorganismo	Nº de aislados	Porcentaje (%)
<i>S.pneumoniae</i>	4	33,3
<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	2	19,6
<i>S. pyogenes</i>	1	8,3
<i>E. coli</i>	2	19,6
<i>A. baumannii</i>	1	8,3
<i>P. jiroveci</i>	1	8,3
M. tuberculosis complex	1	8,3
Total	12	100

Las muestras de las que se realizaron estas 12 determinaciones fueron: 4 hemocultivos, 3 orinas y el resto diferentes muestras respiratorias.

#### **1.8.2 Pacientes con prueba negativa para gripe A H1N1 2009**

Encontramos 85 muestras positivas para algún tipo de microorganismo en 72 pacientes.

*S. pneumoniae* fue el microorganismo que se detectó con más frecuencia (26,9% del total), seguido de enterobacterias como *E. coli* (9

ocasiones) y *K. pneumoniae* (en 8 pacientes). Se encontraron 6 pacientes con infección por *S. aureus*. En la tabla 8 puede observarse la distribución de todos los microorganismos encontrados.

En 13 pacientes se produjo una doble infección por dos microorganismos diferentes.

Las muestras biológicas donde principalmente se hallaron estos microorganismos fueron esputos y hemocultivos (29 y 20 ocasiones respectivamente), seguido de orinas (19 casos). El resto correspondió a un amplio abanico de diferentes muestras, principalmente respiratorias.

De los 72 pacientes con infección probada, 37 (51,4%) fueron diagnosticados de neumonía. Dentro de estos se identificaron 45 microorganismos, con 8 dobles infecciones, siendo el *S. pneumoniae* el microorganismo más prevalente (16 veces; 35,50%), seguido de diversas enterobacterias (15,54%). Las muestras más representativas fueron los esputos (11 aislados) y los hemocultivos (8 aislados).

En el resto de pacientes donde no hubo diagnóstico de neumonía, se identificaron 38 microorganismos, con 5 dobles infecciones, predominando las enterobacterias (19; 49,97%) frente a *S. pneumoniae* (15,78%). En esta ocasión hubo más hemocultivos que esputos (12 frente a 10). En la tabla 9 aparecen todos estos datos.

De los 72 pacientes con infección confirmada, 61 (84,7%) fueron ingresados. De estos, 18 lo hicieron en una unidad de cuidados intensivos, donde se les identificaron 26 bacterias, con 8 dobles infecciones. Las enterobacterias fueron los microorganismos más prevalentes (26,88%), seguidas de cerca por *S. pneumoniae* (23,07%). Los esputos fueron las muestras más representativas (10 aislamientos de los 26), seguidos de los hemocultivos con 6. Los resultados se observan en la tabla 10.

**Tabla 8.** Microorganismos detectados en pacientes con gripe A H1N1 2009 negativa.

Microorganismos	Nº de aislados	Porcentaje (%)
<i>S.pneumoniae</i>	23	26,9
Cocos gram positivos excepto <i>S. pneumoniae</i>	11	12,9
<i>S. aureus</i>	6	54,5
<i>S. agalactiae</i>	1	9,1
<i>E. faecalis</i>	3	27,3
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	9,1
BGN enterobacterias	26	30,4
<i>E. coli</i>	9	34,2
<i>K. pneumoniae</i>	8	30,4
<i>Y. enterocolitica</i>	1	3,8
<i>S. enteritidis</i>	2	7,7
<i>E. aerogenes</i>	1	3,8
<i>P. vulgaris</i>	1	3,8
<i>E. cloacae</i>	2	7,7
<i>C. freundii</i>	1	3,8
<i>M. morganii</i>	1	3,8
Cocobacilos gram negativos	5	5,8
<i>H. influenza</i>	3	60
<i>H. parainfluenza</i>	1	20
<i>M. catarrhalis</i>	1	20
BGN no enterobacterias	10	11,7
<i>P. aeruginosa</i>	4	40
<i>A. hydrophila</i>	1	10
<i>S. maltophilia</i>	1	10
<i>L. pneumophila</i>	2	20
<i>P. fluorescens-putida</i>	1	10
<i>B. cepacea</i>	1	10
Otros	10	11,7
<i>P. acnes</i>	1	10
<i>C. difficile</i>	1	10
<i>P. jiroveci</i>	4	40
<i>M. tuberculosis complex</i>	2	20
<i>N. meningitidis</i>	1	10
<i>A. fumigatus</i>	1	10
Total	85	100

Cocos gram positivos excepto *S. pneumoniae* incluyen: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *Rhodococcus sp.* BGN enterobacterias (bacilos gran negativos enterobacterias) incluyen: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morganii*. Cocobacilos gram negativos incluyen: *H. influenza*, *H. parainfluenza*, *M. catarrhalis*. BGN no enterobacterias (bacilos gran negativos no enterobacterias) incluyen: *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *S. maltophilia*, *L. pneumophila*, *P. fluorescens-putida*, *B. cepacea*. Otros incluyen: *P. acnes*, *C. difficile*, *P. jiroveci*, *M. tuberculosis complex*, *N. meningitidis*, *A. fumigatus*.

**Tabla 9.** Principales microorganismos detectados en pacientes con neumonía y gripe A H1N1 2009 negativa.

Microorganismos	Neumonía			
	Si	Porcentaje (%)	No	Porcentaje (%)
<i>S.pneumoniae</i>	16	35,5	6	15,8
Cocos gram positivos excepto <i>S. pneumoniae</i>	6	13,4	5	13,1
BGN enterobacterias	7	15,6	19	50
Cocobacilos gram negativos	4	8,8	1	2,6
BGN no enterobacterias	5	11,1	4	10,6
Otros	7	15,6	3	7,9
Total	45	100	38	100

Cocos gram positivos excepto *S. pneumoniae* incluyen: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *Rhodococcus* sp. BGN enterobacterias (bacilos gran negativos enterobacterias) incluyen: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morganii*. Cocobacilos gram negativos incluyen: *H. influenza*, *H. parainfluenza*, *M. catarrhali*. BGN no enterobacterias (bacilos gran negativos no enterobacterias) incluyen: *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *S. maltophilia*, *L. pneumophila*, *P. fluorescens-putida*, *B. cepacea*. Otros incluyen: *P. acnes*, *C. difficile*, *P. jiroveci*, *M. tuberculosis complex*, *N. meningitidis*, *A. fumigatus*.

**Tabla 10.** Principales microorganismos detectados en pacientes ingresados en UCI y gripe A H1N1 2009 negativa.

Microorganismos	Ingreso UCI			
	Si	Porcentaje (%)	No	Porcentaje (%)
<i>S.pneumoniae</i>	6	23,2	17	29,3
Cocos gram positivos excepto <i>S. pneumoniae</i>	3	11,5	8	13,8
BGN enterobacterias	7	26,9	19	32,7
Cocobacilos gram negativos	3	11,5	2	3,4
BGN no enterobacterias	3	11,5	6	10,4
Otros	4	15,4	6	10,4
Total	26	100	58	100

Cocos gram positivos excepto *S. pneumoniae* incluyen: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *Rhodococcus* sp. BGN enterobacterias (bacilos gran negativos enterobacterias) incluyen: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morganii*. Cocobacilos gram negativos incluyen: *H. influenza*, *H. parainfluenza*, *M. catarrhali*. BGN no enterobacterias (bacilos gran negativos no enterobacterias) incluyen: *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *S. maltophilia*, *L. pneumophila*, *P. fluorescens-putida*, *B. cepacea*. Otros incluyen: *P. acnes*, *C. difficile*, *P. jiroveci*, *M. tuberculosis complex*, *N. meningitidis*, *A. fumigatus*.



Los otros 53 pacientes que no ingresaron en UCI lo hicieron en diversos servicios del hospital. En este grupo se identificaron 58 microorganismos, 5 dobles infecciones, siendo nuevamente las enterobacterias (32,68%) las mayoritarias por delante de *S. pneumoniae* (29,31%). Espustos, orinas y hemocultivos (19, 16 y 14 microorganismos respectivamente) fueron las muestras biológicas más representativas.

De los 37 pacientes que sufrieron neumonía, 35 requirieron ingreso y 2 no. Estos últimos correspondieron con un paciente con un *S. pneumoniae* en esputo y otro paciente con una doble infección (*S. pneumoniae* en hemocultivo y *H. influenzae* en esputo).

## **2. Estudio de los factores de riesgo asociados a padecer gripe A H1N1 2009**

### **2.1 Análisis univariado**

#### **2.1.1 Edad**

Se dividió la edad en 4 grupos representativos del total de la población. Al aplicar el test estadístico correspondiente, observamos que la edad sí que podría comportarse como un factor a tener en cuenta a la hora de padecer la infección ( $p < 0,001$ ) (tabla 11).

**Tabla 11.** Correlación entre la edad (4 grupos) y la posibilidad de padecer gripe A H1N1 2009.

Rango edad	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Total	Porcentaje (%)	p
0_4	53	9,3	199	13,7	252	12,4	<0,001
5_15	76	13,3	69	4,7	145	7,2	
16_64	401	70,1	851	58,4	1252	61,7	
>65	42	7,3	337	23,2	379	18,7	
Total	572	100	1456	100	2028	100	

Test estadístico utilizado: razón de verosimilitud; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

Al agrupar los niños en un solo grupo, de 0 a 15 años, se obtuvieron los mismos resultados.

### 2.1.2 Sexo

El sexo no se mostró como un factor a tener en cuenta a la hora de padecer la infección por el virus a la vista de los resultados que podemos contemplar en la tabla 12.

**Tabla 12.** Riesgo asociado de padecer la infección según el sexo.

Sexo	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Total	p	OR	IC 95%	
Hombre	325	53,2	783	52,2	1108	0,679	1,041	0,862	1,256
Mujer	286	46,8	717	47,8	1003				
Total	611	100	1500	100	2111				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

### 2.1.3 Tipo de muestra

Al analizar los diferentes tipos de muestra que se recibieron en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos, se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a detectar un caso de gripe A H1N1 2009 según el tipo de muestra que se le tome al paciente (tabla 13).

**Tabla 13.** Correlación entre el tipo de muestra y la posibilidad de detectar una caso de gripe A H1N1 2009.

Tipo de muestra	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Total	p
Nasofaríngeo	363	59,4	838	55,7	1201	0,226
Nasal	114	18,6	319	21,3	433	
Faríngeo	106	17,4	246	16,4	351	
Lavado broncoalveolar	22	3,6	79	5,3	101	
Aspirado bronquial	6	1	19	1,3	25	
Total	611	100	1500	100	2111	

Test estadístico utilizado: razón de verosimilitud; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

### 2.1.4 Sintomatología

De entre todos los síntomas que mostraron los pacientes, la tos ( $p=0,013$ ) y el malestar general ( $p=0,012$ ) fueron los que resultaron

estadísticamente significativos. Los pacientes que mostraban tos en el momento de la toma de la muestra tenían 1,557 veces más de probabilidad de estar infectados por el virus de la gripe. A su vez, aquellos que referían malestar general tenían 1,904 veces más de probabilidad de padecer la infección (tabla 14).

Los pacientes con otros síntomas, como la rinorrea, las artralgias ó el dolor de garganta, poseían también mayor riesgo de infección, aunque esta asociación no resultó ser estadísticamente significativa.

La fiebre en ningún caso se mostró como factor de riesgo asociado a padecer la enfermedad.

**Tabla 14.** Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según la sintomatología existente.

Síntomas	Resultado	Total	%	PCR+	%	PCR-	%	p	OR	IC 95%	
Fiebre	si	618	74,6	172	77,8	446	73,5	0,203	1,267	0,88	1,825
	no	210	25,4	49	22,2	161	26,5				
Tos	si	404	59,1	124	66,7	280	56,2	<b>0,013</b>	<b>1,557</b>	<b>1,095</b>	<b>2,215</b>
	no	280	40,9	62	33,3	218	43,8				
Dolor garganta	si	74	13	25	17,1	49	11,6	0,086	1,577	0,934	2,662
	no	495	87	121	82,9	374	88,4				
Rinorrea	si	65	11,4	23	15,6	42	9,9	0,060	1,683	0,973	2,909
	no	505	88,6	124	84,4	381	90,1				
Mialgias	si	127	21,8	33	23,1	94	21,4	0,676	1,728	0,701	1,728
	no	455	78,2	110	76,9	345	78,6				
Disnea	si	152	27,5	33	23,2	119	29	0,189	0,743	0,477	1,158
	no	401	72,5	109	76,8	292	71				
Diarrea	si	36	6,7	10	7,3	26	6,5	0,763	1,124	0,527	2,394
	no	498	93,3	127	92,7	371	93,5				
Vómitos	si	47	8,8	8	5,9	39	9,8	0,164	0,575	0,262	1,264
	no	487	91,2	128	94,1	359	90,2				
Malestar general	si	79	14,8	29	21,5	50	12,6	<b>0,012</b>	<b>1,904</b>	<b>1,147</b>	<b>3,160</b>
	no	454	85,2	106	78,5	348	87,4				
Cefalea	si	77	13,7	18	12,9	59	13,9	0,745	0,910	0,517	1,603
	no	486	86,3	122	87,1	364	86,1				
Artralgias	si	50	9,4	18	13,3	32	8,1	0,073	1,745	0,945	3,224
	no	480	90,6	117	86,7	363	91,9				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

### **2.1.5 Comorbilidades ó antecedentes personales**

Aquellos pacientes que en el momento del diagnóstico presentaban como antecedente personal padecer enfermedades crónicas del pulmón tenían 1,614 veces más de probabilidad de padecer una infección por virus de la gripe A H1N1 2009 que los que no la tenían ( $p=0,016$ ). Dentro de estas, los asmáticos presentaban un 3,786 más de riesgo de padecer la enfermedad frente a los no asmáticos ( $p<0,001$ ).

Las mujeres embarazadas también mostraron un mayor riesgo de padecer la infección. En concreto un riesgo de 2,896 ( $p=0,020$ ) frente a las mujeres en edad fértil que no estaban embarazadas. Para calcular el riesgo de las mujeres embarazadas seleccionamos únicamente la población femenina en edad fértil (mujeres entre 15 y 50 años).

Encontramos dos comorbilidades que conferían a los individuos afectados una menor predisposición a padecer una infección por el virus. En primer lugar los pacientes afectados de hipertensión arterial (HTA), los cuales tenían un riesgo de 0,565 ( $p=0,024$ ) frente a los no hipertensos, lo que les confiere menor probabilidad de padecer gripe A H1N1 2009. Por otro lado, pacientes con diabetes tipo I y II poseían también un riesgo menor que los no diabéticos ( $p=0,05$ ).

Factores como padecer enfermedades cardíacas, insuficiencia renal crónica o las llamadas comorbilidades mayores procuraban un menor riesgo de infección a los individuos que las padecían, aunque no se mostraron estadísticamente significativas.

No obtuvimos ningún valor significativo en pacientes obesos, pacientes sometidos a algún tipo de inmunosupresión, pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, fumadores ni personas con antecedentes de enfermedades neurológicas.

Todos los resultados pueden observarse en la tabla 15.

**Tabla 15.** Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según los antecedentes personales de los pacientes.

Comorbilidades	Resultado	Total	%	PCR+	%	PCR-	%	p	OR	IC 95%	
<b>Asma</b>	si	78	14,1	41	27,5	37	9,1	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,786</b>	<b>2,311</b>	<b>6,201</b>
	no	477	85,9	108	72,5	369	90,9				
EPOC	si	64	11,9	12	8,7	52	13	0,178	0,637	0,329	1,233
	no	474	88,1	126	91,3	348	87				
Bronquiectasias	si	9	1,7	3	2,2	6	1,5	0,701	1,447	0,357	5,869
	no	518	98,3	133	97,8	385	98,5				
Otra pulmonar	si	24	4,4	5	3,6	19	4,7	0,595	0,762	0,279	2,081
	no	522	95,6	134	96,4	388	95,3				
<b>Enfermedad crónica pulmón</b>	si	167	28,4	56	35,9	111	25,8	<b>0,016</b>	<b>1,614</b>	<b>1,091</b>	<b>2,389</b>
	no	420	71,6	100	64,1	320	74,2				
Obesidad	si	24	4,5	4	2,9	20	5,1	0,302	0,567	0,190	1,688
	no	506	95,5	132	97,1	374	94,9				
<b>HTA</b>	si	128	24,2	23	17	105	26,6	<b>0,024</b>	<b>0,565</b>	<b>0,342</b>	<b>0,933</b>
	no	401	75,8	112	83	289	73,4				
Fumador	si	62	11,8	12	8,9	50	12,8	0,226	0,665	0,343	1,291
	no	464	88,2	123	91,1	341	87,2				
<b>Diabetes tipo I/II</b>	si	69	12,9	11	8,1	58	14,6	<b>0,051</b>	<b>0,514</b>	<b>0,262</b>	<b>1,012</b>
	no	464	87,1	125	91,9	339	85,4				
Corticoides	si	15	2,8	3	2,2	12	3,1	0,770	0,712	0,198	2,563
	no	512	97,2	133	97,8	379	96,9				
Quimioterapia	si	36	6,8	9	6,7	27	6,9	0,941	0,971	0,445	2,120
	no	493	93,2	126	93,3	367	93,1				
HIV/SIDA	si	68	12,5	17	12,2	51	12,5	0,926	0,973	0,541	1,748
	no	478	87,5	122	87,8	356	87,5				
VHC	si	35	6,6	7	5,2	28	7,1	0,438	0,715	0,305	1,676
	no	494	93,4	128	94,8	366	92,9				
VHB	si	6	1,1	5	0,7	1	1,3	1	0,576	0,067	4,976
	no	520	98,9	134	99,3	386	98,7				
Otra inmunosupresión	si	79	14,7	19	13,8	60	15,1	0,709	0,899	0,515	1,569
	no	457	85,3	119	86,2	338	84,9				
Inmunosupresión	si	188	33,6	46	32,2	142	34,1	0,680	0,918	0,612	1,377
	no	372	66,4	97	67,8	275	65,9				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; VHC: virus hepatitis C; VHB: virus hepatitis B; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; IRC: insuficiencia renal crónica.

**Tabla 15 (continuación).** Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según los antecedentes personales de los pacientes.

Comorbilidades	Resultado	Total	%	PCR+	%	PCR-	%	p	OR	IC 95%	
Enfermedad cerebrovascular	si	13	2,5	3	2,2	10	2,6	1	0,859	0,233	3,170
	no	514	97,5	133	97,8	381	97,4				
Convulsiones	si	13	2,5	2	1,5	11	2,8	0,531	0,522	0,114	2,386
	no	515	97,5	133	98,5	382	97,2				
Parálisis cerebral	si	8	1,5	1	0,7	7	1,8	0,686	0,410	0,05	3,367
	no	519	98,5	134	99,3	385	98,2				
Enfermedad neurológica	si	31	5,8	6	4,4	25	6,4	0,407	0,681	0,273	1,698
	no	499	94,2	130	95,6	369	93,7				
Isquemia coronaria	si	35	6,6	5	3,7	0	7,7	0,108	0,461	0,175	1,212
	no	493	93,4	131	96,3	362	92,3				
ICC	si	18	3,4	3	2,2	15	3,8	0,582	0,577	0,165	2,026
	no	513	96,6	132	97,8	381	96,2				
Valvulopatía	si	15	2,9	2	1,5	13	3,3	0,375	0,437	0,097	1,963
	no	511	97,1	133	98,5	378	96,7				
Fallo congénito	si	9	1,7	2	1,5	7	1,8	1	0,821	0,169	4,001
	no	523	98,3	135	98,5	388	98,2				
Enfermedad cardíaca	si	67	12,4	11	8	56	14	0,066	0,534	0,271	1,051
	no	472	87,6	127	92	345	86				
Arritmia	si	29	5,5	4	3	25	6,4	0,135	0,449	0,154	1,316
	no	499	94,5	131	97	368	93,6				
Enfermedad gastrointestinal	si	9	1,7	2	1,5	7	1,8	1	0,825	0,169	0,420
	no	517	98,3	133	98,5	384	98,2				
IRC	si	74	14	13	9,6	61	15,5	0,091	0,582	0,309	1,096
	no	455	86	122	90,4	333	84,5				
Abuso sustancias	si	28	5,3	6	4,4	22	5,6	0,598	0,780	0,309	1,967
	no	498	94,7	129	95,6	369	94,4				
Enfermedad autoinmune	si	15	2,8	3	2,2	12	3,1	0,770	0,720	0,200	2,590
	no	512	97,2	132	97,8	380	96,9				
Cáncer sólido metastásico	si	35	6,6	8	5,9	27	6,8	0,704	0,854	0,378	1,928
	no	497	93,4	128	94,1	369	93,2				
Tumor hematológico	si	47	8,7	8	5,9	39	9,7	0,173	0,582	0,265	1,278
	no	491	91,3	128	94,1	363	90,3				
Cáncer	si	86	15,7	16	11,7	66	16,2	0,199	0,683	0,381	1,225
	no	462	84,3	121	88,3	341	83,8				
Comorbilidades mayores	si	141	25,6	27	19,6	114	27,7	0,061	0,638	0,398	1,024
	no	410	74,4	111	80,4	299	72,3				
<b>Embarazo</b>	si	50	32,5	27	47,4	23	23,8	<b>0,020</b>	<b>2,896</b>	<b>1,439</b>	<b>5,828</b>
	no	104	67,5	30	52,6	74	76,2				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; VHC: virus hepatitis C; VHB: virus hepatitis B; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; IRC: insuficiencia renal crónica.

### **2.1.6 Complicaciones**

El padecer una neumonía no se asoció a estar infectado por gripe A ( $p < 0,001$ ). Es decir, dentro de la población estudiada, los pacientes con neumonía tenían más probabilidad de tener neumonía por otra causa que por el hecho de estar infectados por el virus de la influenza A H1N1 2009.

El shock y la sepsis tampoco se asociaron a padecer una infección por el virus de la gripe. Así, los pacientes que durante su estancia en el hospital sufrieron un shock y/o sepsis, tenían más probabilidad de sufrir esta complicación por otra causa que no fuera la infección por el virus de la gripe A H1N1 2009. Todos estos resultados pueden observarse en la tabla 16.

### **2.1.7 Coinfecciones**

Se analizó si la aparición de otros microorganismos podía contribuir a la adquisición de la enfermedad gripal. En nuestro estudio el poseer una infección por otro microorganismo hacía menos probable la aparición de gripe A H1N1 2009 ( $p = 0,002$ ; OR: 0,346; IC 95%: 0,175-0,686)

### **2.1.8 Ingreso**

El estar ingresado no se pudo relacionar con padecer la infección ( $p = 0,009$ ). Es decir, los pacientes que no ingresaron tenían más probabilidad de padecer la infección por el virus de la influenza A H1N1 2009 que los que lo hicieron. Por tanto, la mayor parte de los pacientes que ingresaron lo hicieron por infecciones distintas a la gripe.

Lo mismo sucedió con los pacientes que ingresaron en UCI, factor que se comportó como “protector” frente a la gripe A ( $p = 0,005$ ).

Tampoco se relacionó el exitus con padecer gripe A H1N1 2009, todo lo contrario, en la población de estudio aquellos que no fallecieron mostraron mayor probabilidad de padecer gripe A que los que murieron ( $p = 0,056$ ). En la tabla 17 se pueden ver todos los resultados.

**Tabla 16.** Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según las complicaciones presentes en la enfermedad.

Complicaciones	Resultado	Total	%	PCR+	%	PCR-	%	p	OR	IC 95%	
Neumonía	si	290	43,2	49	30,6	241	47,2	<0,001	0,495	0,339	0,722
	no	381	56,8	111	69,4	270	52,8				
Hipoxemia	si	38	7,1	7	5,1	31	7,7	0,293	0,638	0,274	1,483
	no	501	92,9	131	94,9	370	92,3				
SDRA	si	13	2,5	1	0,7	12	3,1	0,200	0,236	0,030	1,830
	no	513	97,5	134	99,3	379	96,9				
Neumonía 2ª	si	0	0	0	0	0	0	NR	NR	NR	NR
	no	526	100	135	100	391	100				
Shock	si	22	4,2	1	0,7	21	5,4	0,021	0,132	0,018	0,990
	no	505	95,8	134	99,3	371	94,6				
Sepsis	si	25	4,7	2	1,5	23	5,8	0,038	0,241	0,056	1,035
	no	505	95,3	134	98,5	371	94,2				
Alteración función hepática	si	11	2,1	2	1,5	9	2,3	0,737	0,635	0,136	2,977
	no	517	97,9	134	98,5	383	97,7				
Fracaso renal agudo	si	18	3,4	3	2,2	15	3,8	0,582	0,574	0,164	2,015
	no	511	96,6	132	97,8	379	96,2				
Alteraciones cardíacas	si	6	1,1	1	0,7	5	1,3	1	0,581	0,067	5,014
	no	523	98,9	134	99,3	389	98,7				
CID	si	3	0,6	0	0	3	0,8	0,574	NR	NR	NR
	no	526	99,4	135	100	391	99,2				
Derrame pleural	si	28	5,3	0	0	28	7,1	0,020	NR	NR	NR
	no	503	94,7	135	100	368	92,9				
Neumotórax	si	8	1,5	1	0,7	7	1,8	0,390	0,686	0,050	3,359
	no	522	98,5	135	99,3	387	98,2				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo; CID: coagulación intravascular diseminada; NR: no realizado.



**Tabla 17.** Riesgos asociados a padecer gripe A H1N1 2009 según ingreso.

	SI/NO	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
<b>Ingreso</b>	si	72	38,7	256	49,9	<b>0,009</b>	<b>0,634</b>	<b>0,450</b>	<b>0,893</b>
	no	114	61,3	257	50,1				
<b>Ingreso UCI</b>	si	4	8,9	41	91,1	<b>0,005</b>	<b>0,253</b>	<b>0,089</b>	<b>0,716</b>
	no	182	27,8	472	72,2				
<b>Exitus</b>	si	2	8,3	22	91,7	<b>0,056</b>	<b>0,243</b>	<b>0,056</b>	<b>1,042</b>
	no	184	27,3	491	72,7				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

## 2.2 Análisis multivariante

### 2.2.1 Población general

Al aplicar el modelo multivariante a aquellos factores que resultaron significativos por el modelo univariado o que tenían alguna relevancia clínica, obtuvimos los siguientes resultados (tabla 18):

El padecer asma se asoció a una mayor probabilidad de estar infectado por el virus ( $p < 0,001$ ).

Los pacientes que referían en el momento del diagnóstico malestar general y dolor de garganta tenían más probabilidades de padecer la infección ( $p = 0,012$  y  $p = 0,048$  respectivamente).

Las personas mayores de 65 años tenían menor probabilidad de padecer gripe A H1N1 2009 que el resto de población adulta (hasta los 15 años) ( $p = 0,001$ ). El hecho de tener más de 65 años se considera un factor protector para adquirir la infección.

El resto de variables fueron eliminadas por el modelo. Por tanto, tener o padecer gripe A H1N1 2009 en la población de estudio, se asoció a pacientes que presentaban malestar general y dolor de garganta en el momento del diagnóstico, pacientes asmáticos e individuos menores de 65 años.

**Tabla 18.** Factores asociados a padecer gripe A H1N1 2009 en población de estudio. Modelo multivariante de regresión logística.

Variables	Resultado	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Pcruda	ORcruda	IC 95%		Pajustada	OR ajustada	IC 95%	
<b>Asma</b>	si	41	27,5	37	9,1	<0,001	3,786	2,311	6,201	<0,001	<b>3,651</b>	<b>1,829</b>	<b>6,931</b>
	no	108	72,5	369	90,9								
<b>Malestar general</b>	si	29	21,5	50	12,6	0,012	1,904	1,147	3,160	<b>0,012</b>	<b>2,041</b>	<b>1,166</b>	<b>3,572</b>
	no	106	78,5	348	87,4								
<b>Dolor garganta</b>	si	25	17,1	49	11,6	0,086	1,577	0,934	2,662	<b>0,048</b>	<b>2,272</b>	<b>1,007</b>	<b>5,125</b>
	no	121	82,9	374	88,4								
<b>Edad</b>	>65	42	9,5	337	28,4	<0,001	0,264	0,188	0,372	<b>0,001</b>	<b>0,369</b>	<b>0,206</b>	<b>0,660</b>
	16_64	401	90,5	851	71,6								
Tos	si	124	66,7	280	56,2	0,013	1,557	1,095	2,215	0,910	0,974	0,613	1,546
	no	62	33,3	218	43,8								
Rinorrea	si	23	15,6	42	9,9	0,060	1,683	0,973	2,909	0,108	2,307	0,832	6,398
	no	124	84,4	381	90,1								
HTA	si	23	17	105	26,6	0,024	0,565	0,342	0,933	0,940	0,977	0,532	1,795
	no	112	83	289	73,4								
Diabetes tipo I/II	si	11	8,1	58	14,6	0,051	0,514	0,262	1,012	0,247	0,632	0,291	1,374
	no	125	91,9	339	85,4								
Enfermedad cardiaca	si	11	8	56	14	0,066	0,534	0,271	1,051	0,655	0,823	0,351	1,930
	no	127	92	345	86								

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia. En negrita, variables definitivas que acepta el modelo.

### **2.2.2 Mujeres en edad fértil**

Para poder incluir el embarazo como variable en el estudio multivariante de los factores asociados a padecer gripe A H1N1 2009, se seleccionó la población con posibilidad de quedarse embarazada (mujeres fértiles entre los 15 a los 50 años).

En el modelo se incluyeron algunas de las variables estudiadas en el modelo de población general añadiendo el embarazo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 19):

Las mujeres embarazadas tenían una mayor probabilidad de padecer gripe A H1N1 2009 ( $p < 0,01$ ).

El asma y el malestar general también fueron factores que se asociaron a padecer la infección por el virus en el grupo de mujeres fértiles.

Las otras dos variables (comorbilidades mayores y diabetes tipo I/II) fueron eliminadas por el modelo.

Por tanto, en la población de mujeres fértiles (15-50 años), el embarazo, el malestar general y el antecedente de sufrir asma se asoció a una mayor probabilidad de padecer gripe A H1N1 2009.

**Tabla 19.** Factores asociados a padecer gripe A H1N1 2009 en mujeres fértiles (15-50 años). Modelo multivariante de regresión logística

Variables	Resultado	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Pcruda	ORcruda	IC 95%		Pajustada	OR ajustada	IC 95%	
<b>Embarazo</b>	si	27	47,4	23	23,8	0,020	2,896	1,439	5,828	<b>0,010</b>	<b>5,422</b>	<b>2,308</b>	<b>12,737</b>
	no	30	52,6	74	76,2								
<b>Asma</b>	si	15	25,9	17	18,5	0,282	1,539	0,699	3,388	<b>0,041</b>	<b>2,864</b>	<b>1,042</b>	<b>7,870</b>
	no	43	74,1	75	81,5								
<b>Malestar general</b>	si	12	22,7	12	13,6	0,168	1,854	0,764	4,495	<b>0,070</b>	<b>2,510</b>	<b>0,927</b>	<b>6,796</b>
	no	41	77,3	76	86,4								
Diabetes tipo I/II	si	1	1,9	6	6,9	0,253	0,260	0,030	2,219	0,512	0,479	0,053	4,317
	no	52	98,1	81	93,1								
Comorbilidades mayores	si	4	7,6	18	19,8	0,049	0,331	0,106	1,038	0,781	0,834	0,232	2,999
	no	49	92,4	73	80,2								

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia. En negrita, variables definitivas que acepta el modelo.

### **3. Cálculo de las cargas virales**

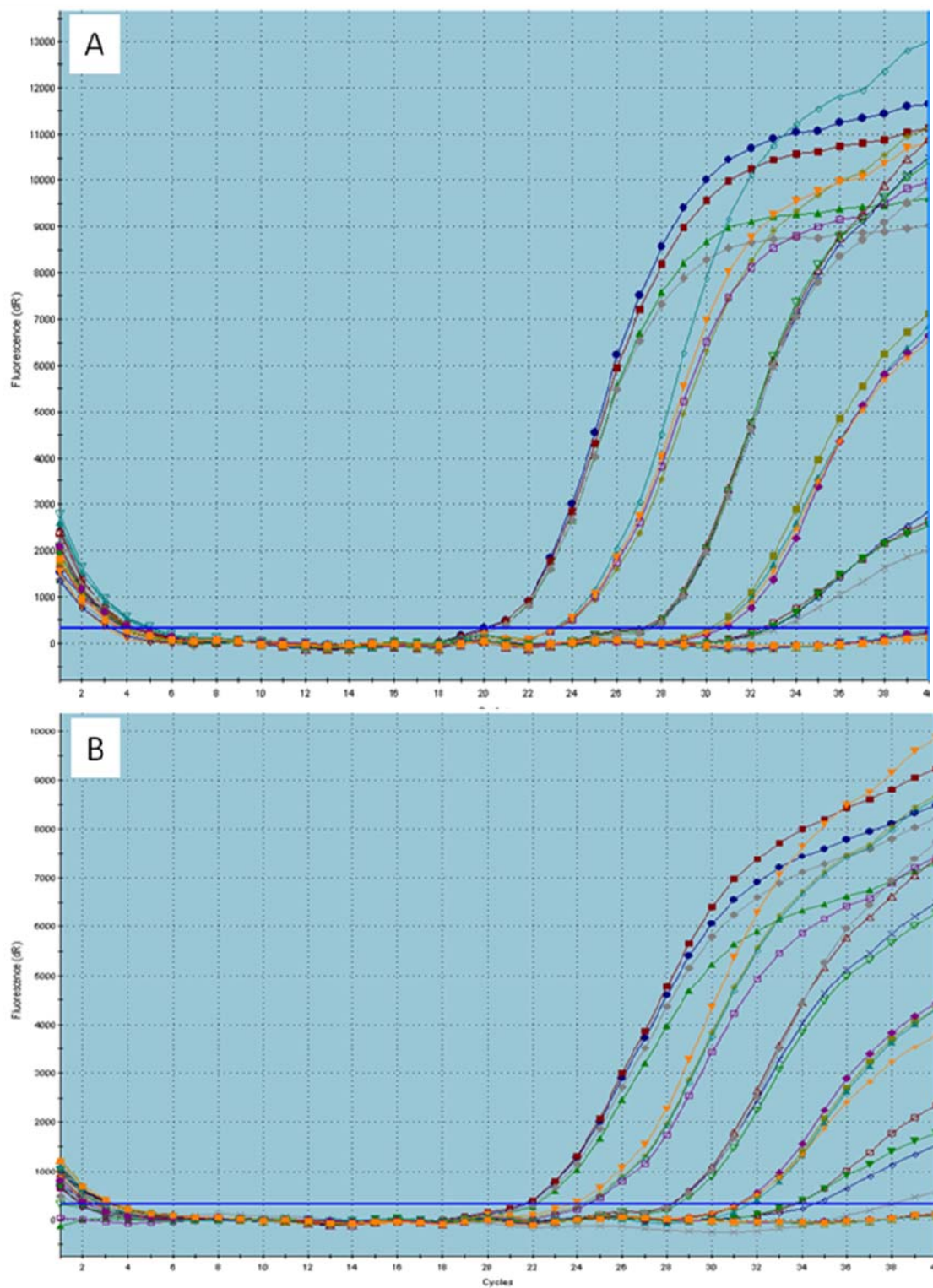
#### **3.1 Curvas patrón**

Cada dilución realizada a partir del liofilizado suministrado por el fabricante, con un número de copias conocido, se analizó por PCR a tiempo real, tanto para el gen H1 como para el M2. Cada dilución se analizó por cuadruplicado en 5 ensayos diferentes e independientes.

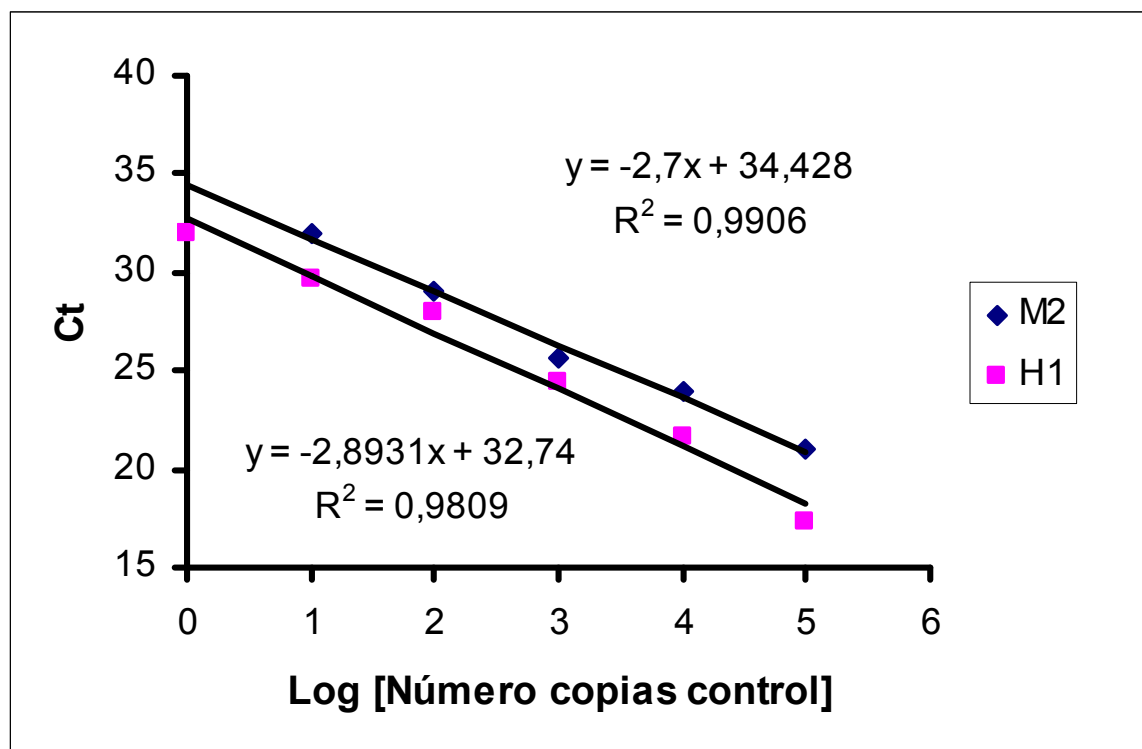
Se observó que, a medida que aumentaba la dilución y, por tanto, disminuía el número de copias, las curvas de fluorescencia empezaban a aparecer en ciclos umbral (Ct) más tardíos (figura 15). El desplazamiento de los Ct era de, aproximadamente, 3 ciclos por cada dilución. Se obtuvo una excelente correlación entre las 4 curvas de cada dilución en los ensayos de ambos genes.

El análisis comparativo de las dos dianas, permitió observar que, para cada una de las diluciones, había una diferencia de dos ciclos entre los ensayos realizados con el gen H1 y con el M2. Es decir, para una misma dilución y por tanto, para un mismo número de copias, el gen H1 empezaba a emitir fluorescencia 2 Ct antes que el gen M2 (figura 15). Esta diferencia fue idéntica en todos los ensayos realizados indicando que la detección del gen H1 era más sensible que la del gen M2, y por tanto, era más adecuada para los cálculos de carga viral de las muestras clínicas.

Las rectas de regresión obtenidas tras el ajuste por mínimos cuadrados, tanto para el gen H1 como para el M2, y a partir de las cuales se calcularon los valores de carga viral de las distintas muestras, se muestran en la figura 16.



**Figura 15.** Curvas de emisión de fluorescencia de las diferentes diluciones, por cuádruplicado, realizadas a partir de la liofilizada madre para el gen H1 (figura A) y para el gen M2 (figura B).



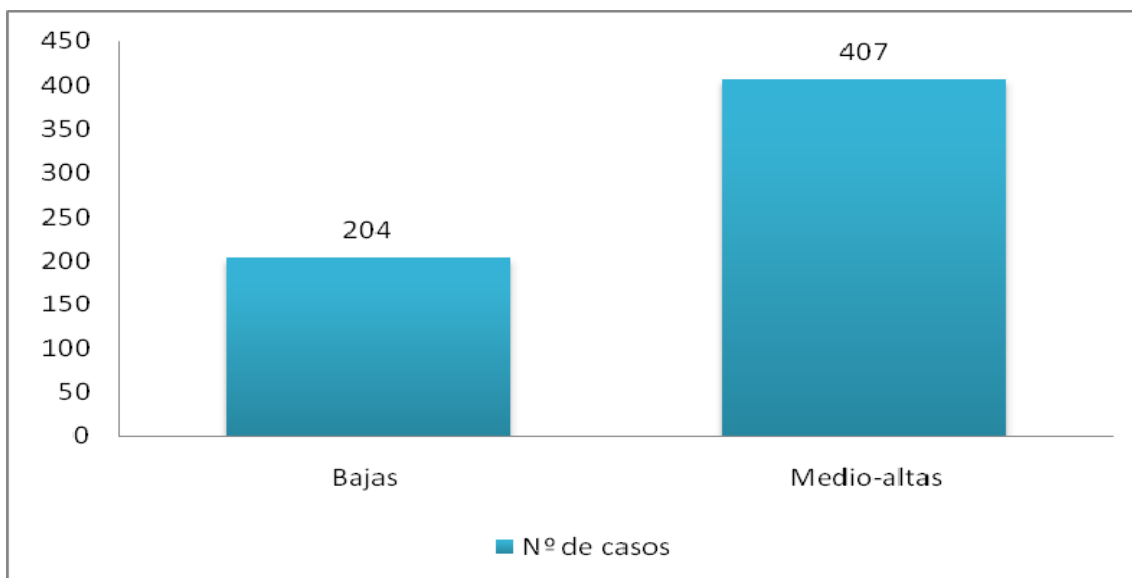
**Figura 16.** Curvas patrón calculadas para gen H1 y M2.

### 3.2 Carga viral de las muestras recibidas

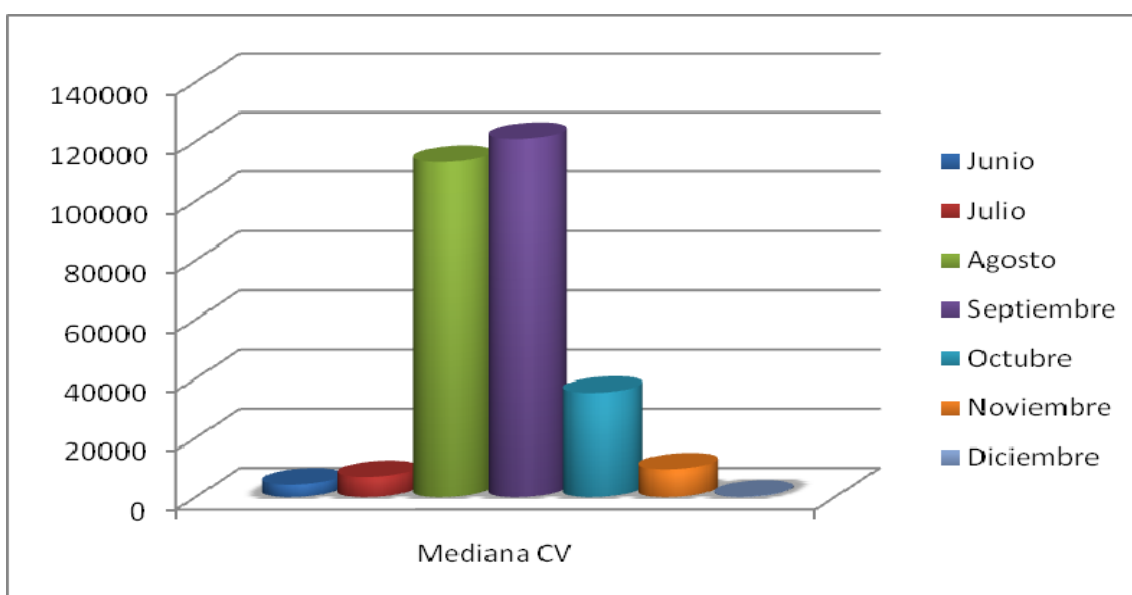
El valor de la carga viral media de las 611 muestras positivas fue de  $1,5 \times 10^6$  cop/ml (DT= 6720639) y el de la mediana de  $1,94 \times 10^4$  cop/ml (p25=765,78; p75=506536,72).

El 67% de las muestras poseían valores de carga viral medio-alta (mayores de 2000 cop/ml) (figura 17).

Al principio de la pandemia se obtuvieron valores de carga viral próximos a  $10^3$  cop/ml. Los valores de carga viral fueron superiores durante los meses de Agosto y Septiembre (medianas de carga viral en torno a  $10^5$  cop/ml), descendiendo paulatinamente durante los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre (medianas de carga viral de  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  cop/ml respectivamente), meses de mayor incidencia de gripe en nuestro país (figura 18).



**Figura 17.** Distribución de casos según valores de carga viral. Bajas: cargas virales menores de 2000 cop/ml; medio-altas: cargas virales mayores de 2000 cop/ml



**Figura 18.** Distribución de valores de mediana de carga viral por meses. CV: carga viral.

#### **4. Estudio de la carga viral y factores que la modifican**

##### **4.1 Análisis univariado**

Una vez determinada la carga viral de todas las muestras incluidas en el estudio, se analizaron los factores que podían influir en los valores obtenidos.



Se realizó un análisis cuantitativo del valor de la carga viral, mediante el estudio de las medianas de las diferentes variables a estudio. Posteriormente se llevó a cabo un análisis cualitativo de las mismas dividiendo las cargas virales en dos terciles.

#### 4.1.1 Sexo

La mediana de carga viral en hombres fue de  $1,41 \times 10^4$  copias/ml y en mujeres de  $3 \times 10^4$  copias/ml., No se encontró, por tanto, diferencia significativa entre un sexo y otro (Test de Mann-Whitney,  $p=0,692$ )

Al agrupar las cargas virales medio-altas ( $\geq 2000$  copias/ml) frente a las bajas ( $< 2000$  copias/ml), se obtuvieron los mismos resultados (tabla 20).

**Tabla 20.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por edad y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y test estadístico correspondiente.

	CV (cop/ml)				p	OR	IC 95%	
	≥2000		<2000					
Sexo	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)				
Hombre	215	52,8	110	53,9	0,798	0,957	0,683	1,341
Mujer	192	47,2	94	46,1				
Total	407	100	204	100				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral.

#### 4.1.2 Edad

Al estudiar la edad en diferentes grupos se observó que existía una diferencia significativa ( $p=0,013$ ) en cuanto a valores de mediana de carga viral. Así, en menores de 4 y mayores de 65 años se encontraron cargas virales menores (de  $10^3$  copias/ml) que las encontradas en grupos de edad de 5 a 64 años (valores de mediana de carga viral de  $10^4$  copias/ml) (tabla 21).

Al agrupar las cargas virales medio-altas frente a las bajas (tabla 22) no se encontró asociación entre el tramo de edad y el valor de carga viral obtenido.

#### 4.1.3 Tipo de muestra

No hubo diferencias importantes en los valores de carga viral entre las distintas muestras biológicas recibidas. La mediana de cada una de ellas se mantuvo en cifras de  $10^4$  copias/ml, salvo en aspirados bronquiales, donde fue de  $1,5 \times 10^2$  copias/ml (tabla 23).

**Tabla 21.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por grupos de edad y test estadístico correspondiente.

Edad	Nº casos	Mediana CV (cop/ml)	Percentil 25	Percentil 75	p
0_4	53	9470,23	199,66	298482,94	<b>0.013</b>
5_15	76	52462,89	2513,61	939169,85	
16_64	401	20989,92	784,51	506536,72	
>65	42	4189,43	90,22	93325,98	
Desconocido	39	4272,78	392,42	103112,41	
Total	611				

Test estadístico utilizado: test de Kruskal-Wallis; CV: carga viral.

**Tabla 22.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por edad y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y test estadístico correspondiente.

	CV (cop/ml)				
	≥2000		<2000		
Edad	Nº de casos	Porcentaje (%)	Nº de casos	Porcentaje (%)	p
0_4	31	8,2	22	11,7	0,118
5_15	58	15,4	18	9,6	
16_64	270	71,8	131	69,7	
>65	17	4,5	17	9	

Test estadístico utilizado: razón de verosimilitud. CV: carga viral.

Tampoco se encontró ninguna diferencia al distribuir los valores de carga viral en dos terciles, como puede observarse en la tabla 24.

**Tabla 23.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por tipo de muestra y test estadístico correspondiente

Muestra	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	Percentil 25	Percentil 75	p
Nasofaríngeo	363	59,4	20989,92	869,78	506536,72	0,721
Nasal	114	18,3	20187,02	659,83	506536,72	
Faríngeo	106	17	13559,61	405,16	517027,31	
Lavado broncoalveolar	22	3,5	32953,19	2087,49	392462,34	
Aspirado bronquial	6	1	151,47	99,10	33308577	
Total	611	100				

Test estadístico utilizado: test de Kruskal-Wallis. CV: carga viral.

**Tabla 24.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por tipo de muestra y rango de cargas virales (cop/ml) (dos terciles) y test estadístico correspondiente.

	CV (cop/ml)				
	≥2000		<2000		
Muestra	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p
Nasofaríngeo	243	59,7	120	58,8	0,241
Nasal	70	16,8	36	17,6	
Faríngeo	74	17,8	40	19,6	
Lavado broncoalveolar	18	4,2	4	2	
Aspirado bronquial	2	0,5	4	2	
Total	407	100	204	100	

Test estadístico utilizado: razón de verosimilitud; CV: carga viral.

#### 4.1.4 Sintomatología

Se analizaron las posibles correlaciones entre los valores de carga viral de las muestras recibidas y la sintomatología que presentaban los pacientes en el momento del diagnóstico. Los valores de mediana de carga viral (cop/ml) pueden observarse en la tabla 25.

**Tabla 25.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por sintomatología y test estadístico correspondiente.

Sintomatología	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	P25	P75	p
Fiebre	si	172	77,8	32543,35	408,68	895457,18	0,443
	no	49	22,2	103112,41	4272,78	772334,49	
Tos	si	124	66,7	32543,35	675,01	895457,18	0,911
	no	62	33,3	103112,41	177,06	772334,49	
Dolor garganta	si	25	17,1	14098,92	2087,50	153509,74	0,940
	no	121	82,9	61466,49	392,43	506536,72	
Rinorrea	si	23	15,6	120904,08	2870,03	2488346,87	0,240
	no	124	84,4	46154,94	392,43	506536,72	
Mialgias	si	33	23	46522,28	1927,80	1122692,77	0,379
	no	110	77	46522,28	392,43	506536,72	
Disnea	si	33	23,2	6361,15	362,41	228539,32	0,306
	no	109	76,8	46522,28	424,94	772334,49	
Diarrea	si	10	7,3	15230,08	424,94	120904,08	0,286
	no	127	92,7	46522,28	392,43	772334,49	
Vómitos	si	8	5,9	30181,70	224,57	1225744,01	0,563
	no	128	94,1	46522,28	392,43	574838,66	
<b>Malestar general</b>	si	29	21,5	1927,80	177,06	120904,08	<b>0,050</b>
	no	106	88,5	96588,12	869,78	772334,49	
Cefalea	si	18	12,8	141554,84	1927,80	506536,72	0,298
	no	122	87,2	46522,28	392,43	643140,60	
Artralgias	si	18	13,3	5170,01	101,43	179997,28	0,190
	no	117	84,7	70371,85	869,78	696419,51	

Test estadístico utilizado: test de Mann-Whitney; CV: carga viral; P25: percentil 25; P75: percentil 75.

Los pacientes que referían tener malestar general presentaban cargas virales más bajas que aquellos que no lo tenían ( $p=0,05$ ). Estos primeros poseían un valor de mediana de carga viral de  $1,9 \times 10^3$  cop/ml frente a  $9,7 \times 10^4$  cop/ml de los segundos.

Los pacientes con fiebre, tos y vómitos mostraron tener un logaritmo inferior de mediana de carga viral ( $10^4$  cop/ml) que los que no tenían estos síntomas ( $10^5$  cop/ml), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Se obtuvieron resultados semejantes con los pacientes que sufrían disnea y artralgias; los individuos con esta sintomatología presentaban valores de carga viral de  $10^3$  cop/ml frente a los que no lo presentaban, con valores de  $10^4$  cop/ml.

Por el contrario, los pacientes con rinorrea y cefalea poseían cargas virales un logaritmo por encima de los que no lo sufrían ( $10^5$  frente  $10^4$  cop/ml, respectivamente). Esta asociación no resultó significativa.

En general, los pacientes que referían alguna de las sintomatologías estudiadas, poseían valores de carga viral un logaritmo inferior a aquellos pacientes que carecían de esos síntomas, salvo en el caso de las cefaleas y rinorreas, donde ocurrió al revés. Sin embargo, este hecho únicamente fue significativo en el caso del malestar general ( $p=0,05$ ).

El análisis cualitativo, agrupando la carga viral en dos grupos, mostró que los pacientes que referían tener fiebre y malestar general en el momento del diagnóstico tenían más probabilidades de tener una carga viral  $<2000$  cop/ml que los que no tenían fiebre ( $p=0,054$ ) ni malestar general ( $p=0,009$ ).

Los pacientes con dolor de garganta, rinorrea, mialgias y cefalea poseían, en general, cargas virales por encima de 2000 cop/ml, mientras que aquellas personas con tos, disnea, vómitos y artralgias presentaban valores de carga viral por debajo de este valor, aunque esta relación no fue en ninguno de los casos estadísticamente significativa. Un compendio de los resultados puede observarse en la tabla 26.

#### **4.1.5 Comorbilidades o antecedentes personales**

Se analizaron los diferentes tipos de comorbilidades que presentaban los pacientes para esclarecer si existía alguna relación entre el valor de la carga viral y las comorbilidades presentes. Las comorbilidades estudiadas y los valores de carga viral asociados pueden observarse en la tabla 27.

Los pacientes con comorbilidades mayores, tenían una mediana de carga viral 2 logaritmos inferior ( $2,1 \times 10^2$  cop/ml) a los que no padecían estas patologías ( $7,5 \times 10^4$  cop/ml) ( $p=0,012$ ).

**Tabla 26.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por sintomatología y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml) y test estadístico correspondiente.

		CV (cop/ml)							
		≥2000		<2000					
Sintomatología	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
Fiebre	si	108	74	64	85,3	0,054	0,488	0,233	1,023
	no	38	26	11	14,7				
Tos	si	79	64,2	45	71,4	0,324	0,718	0,371	1,389
	no	44	35,8	18	28,6				
Dolor garganta	si	19	19,6	6	12,2	0,266	1,746	0,648	4,700
	no	78	80,4	43	87,8				
Rinorrea	si	18	18,6	5	10	0,176	2,051	0,713	5,897
	no	79	81,4	45	90				
Mialgias	si	23	24,2	10	20,8	0,651	1,214	0,524	2,812
	no	72	75,8	38	79,2				
Disnea	si	20	21,7	13	26	0,566	0,791	0,354	1,765
	no	72	78,3	37	74				
Diarrea	si	6	6,7	4	8,5	0,736	0,768	0,206	2,867
	no	84	93,3	43	91,5				
Vómitos	si	4	4,5	4	8,3	0,452	0,524	0,125	2,196
	no	84	9,5	44	91,7				
Malestar general	si	13	14,8	16	34	0,009	0,336	0,145	0,780
	no	75	85,2	31	66				
Cefalea	si	13	14,1	5	10,4	0,533	1,415	0,473	4,236
	no	79	85,9	43	89,6				
Artralgias	si	9	10,2	9	19,1	0,146	0,481	0,177	1,310
	no	79	89,8	38	80,9				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral.

Igualmente, los pacientes con cáncer sólido metastásico tenían 2 logaritmos menos de carga viral que los que no padecían esta enfermedad ( $p=0,013$ ). El conjunto de todos los pacientes con cáncer (no solo metastásico), tuvieron un valor de carga viral de  $2,1 \times 10^2$  cop/ml frente a las  $6,1 \times 10^4$  cop/ml de los que no lo padecían ( $p=0,016$ ).

Pudo observarse que fumadores, personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes con tratamiento quimioterápico y

pacientes con enfermedades neurológicas, tenían un logaritmo menos de mediana de carga viral que los que no tenían ninguno de estos antecedentes ( $10^3$  frente a  $10^4$  cop/ml respectivamente), aunque no se encontró significación estadística.

Por el contrario, personas con antecedentes de asma, diabétes, embarazadas e insuficiencia renal crónica (IRC) poseían cargas virales de un logaritmo por encima de los que no sufrían estas comorbilidades ( $10^5$  frente a  $10^4$  cop/ml), aunque tampoco hubo relación significativa.

Cuando se agruparon las cargas virales en medio-altas ( $\geq 2000$  cop/ml) y bajas ( $< 2000$  cop/ml), se observó que los pacientes que padecían de forma crónica una enfermedad pulmonar, tenían más probabilidad de tener cargas virales por encima de 2000 cop/ml que los que no la padecían ( $p=0,033$ ).

Asimismo pudo observarse que en pacientes que presentaban un antecedente tipo “otra inmunosupresión” (la mayoría de casos pacientes renales trasplantados), la probabilidad de tener cargas virales por encima de 2000 cop/ml se establecía en 5,169 veces más que en los que no se observaba esta inmunosupresión ( $p=0,02$ ).

Por el contrario, los pacientes con algún tipo de cáncer, pacientes con cáncer sólido metastásico y pacientes con comorbilidades mayores tuvieron significativamente cargas virales menores de 2000 cop/ml ( $p=0,014$ ;  $p=0,02$  y  $p=0,012$  respectivamente).

En conjunto, los factores de riesgo que se asociaron a cargas virales por encima de 2000 cop/ml fueron los siguientes: asma, pacientes EPOC, obesidad, diabetes, inmunosuprimidos, enfermedades cardiacas, IRC y mujeres embarazadas, aunque ninguna de estas asociaciones tuvo significación estadística.

Factores como la HTA, tabaquismo, tratamiento quimioterápico, VIH, enfermedad neurológica y tumor hematológico suelen relacionarse con cargas virales bajas ( $< 2000$  cop/ml) aunque esta relación tampoco fue estadísticamente significativa. Todos los resultados pueden observarse en la tabla 28.

**Tabla 27.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por comorbilidades y test estadístico correspondiente.

Comorbilidades	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	P25	P75	p
Asma	si	41	27,5	103112,41	2650,46	575327,23	0,188
	no	108	72,5	18760,00	359,54	866610,87	
EPOC	si	12	8,7	65985,36	1003,84	343267,00	0,700
	no	126	91,3	46522,28	392,43	696419,51	
Enfermedad crónica pulmonar	si	56	35,9	82289,45	3461,62	568540,13	0,275
	no	100	64,1	18760,78	359,54	1036802,24	
Obesidad	si	4	4,4	89986,29	30498,15	1304625,47	0,629
	no	132	95,6	46522,28	392,43	669780,05	
HTA	si	23	17,1	14098,92	101,43	506536,72	0,436
	no	112	82,9	60267,50	442,54	669780,05	
Fumador	si	12	8,9	1478,64	236,12	343267,00	0,353
	no	123	91,1	61466,49	424,94	696419,51	
Diabetes tipo I/II	si	11	8,1	120904,08	1927,80	314210,67	0,621
	no	125	91,9	45787,61	392,43	643140,60	
HIV/SIDA	si	17	12,3	3644,02	177,06	31248,99	0,070
	no	122	87,7	65919,00	392,43	696419,51	
Quimioterapia	si	9	6,7	24,21	13,87	153509,74	0,138
	no	126	93,3	52795,39	803,24	643140,60	
Otra inmunosupresión	si	19	13,8	90063,84	9470,24	1036802,24	0,116
	no	119	86,2	46522,28	356,68	696419,51	
Inmunosupresión	si	46	32,2	16507,06	869,78	506536,72	0,446
	no	97	67,8	61466,49	392,43	772334,49	
Enfermedad neurológica	si	6	4,4	3220,52	70,89	2917701,90	0,461
	no	130	95,6	52795,39	460,14	506536,72	

Test estadístico utilizado: test de Mann-Whitney; CV: carga viral; P25: percentil 25; P75: percentil 75; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; IRC: insuficiencia renal crónica.



**Tabla 27 (continuación).** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por comorbilidades y test estadístico correspondiente.

Comorbilidades	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	P25	P75	p
Enfermedad cardíaca	si	11	8	74998,22	869,78	3421140,55	0,457
	no	127	92	46522,28	392,43	506536,72	
IRC	si	13	9,7	314210,67	74998,22	1036802,24	0,151
	no	122	90,3	33388,77	362,41	506536,72	
<b>Cáncer sólido metastásico</b>	si	8	5,9	187,77	15,07	51786,28	<b>0,013</b>
	no	128	94,1	65919,17	869,78	734377,00	
Tumor hematológico	si	8	5,9	51590,27	15,77	1320928,30	0,400
	no	128	94,1	46522,28	442,54	574838,66	
<b>Cáncer</b>	si	16	11,7	212,41	15,07	128311,08	<b>0,016</b>
	no	121	88,3	61466,49	869,78	696419,51	
<b>Comorbilidades mayores</b>	si	27	19,6	803,24	24,21	103112,41	<b>0,012</b>
	no	111	80,4	74998,22	1294,90	772334,49	
Embarazo	si	27	47,4	506536,72	392,43	5093260,80	0,092
	no	30	52,6	52795,39	869,78	506536,72	

Test estadístico utilizado: test de Mann-Whitney; CV: carga viral; P25: percentil 25; P75: percentil 75; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; IRC: insuficiencia renal crónica.

#### 4.1.6 Complicaciones

Se estudió la posible relación entre las complicaciones de la enfermedad producida por la infección por el virus de la gripe A H1N1 2009 y la carga viral detectada.

El análisis cuantitativo de las cargas virales nos mostró que los pacientes que padecían neumonía tenían significativamente ( $p=0,008$ ) un logaritmo menos de carga viral que los que no la padecían ( $1,4 \times 10^3$  frente a  $7,5 \times 10^4$  cop/ml respectivamente).

El resto de valores carecieron de importancia debido a los pocos datos de pacientes con otras complicaciones de los que se disponía (tabla 29).

**Tabla 28.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por comorbilidades y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml), y riesgos asociados.

		CV (cop/ml)							
		≥2000		<2000					
Comorbilidad	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
Asma	si	32	32	9	18,4	0,080	2,092	0,906	4,827
	no	68	68	40	81,6				
EPOC	si	9	8,9	4	8,3	1,000	1,073	0,306	3,764
	no	92	91,1	44	91,7				
Enfermedad crónica pulmonar	si	44	41,5	12	24	0,033	2,247	1,056	4,783
	no	62	58,5	38	76				
Obesidad	si	3	3,4	1	2,1	1,000	1,605	0,162	15,867
	no	86	96,6	46	97,9				
HTA	si	14	15,9	9	19,1	0,633	0,799	0,317	2,013
	no	74	84,1	38	80,9				
Fumador	si	6	6,8	6	12,8	0,341	0,500	0,152	1,647
	no	82	93,2	41	87,2				
Diabetes tipo I/II	si	8	9,6	3	6,3	0,746	1,500	0,379	5,940
	no	80	90,4	45	93,8				
Quimioterapia	si	4	5,1	5	10,6	0,276	0,400	0,102	1,568
	no	84	94,9	42	89,4				
HIV/SIDA	si	10	11,2	7	14	0,633	0,778	0,276	2,189
	no	79	88,8	43	86				
Otra inmunosupresión	si	17	28,7	2	4,3	0,020	5,169	1,140	23,428
	no	74	81,3	45	95,7				
Inmunosupresión	si	32	34,4	14	28	0,434	1,349	0,637	2,859
	no	61	65,6	36	72				
Enfermedad neurológica	si	3	3,4	3	6,4	0,416	0,512	0,099	2,640
	no	86	96,6	44	93,6				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; IRC: insuficiencia renal crónica.

**Tabla 28 (continuación).** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por comorbilidades y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml), y riesgos asociados

		CV (cop/ml)							
		≥2000		<2000					
Comorbilidad	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
Enfermedad cardiaca	si	8	8,8	3	6,4	0,749	1,414	0,357	5,598
	no	83	91,2	44	93,6				
IRC	si	10	11,9	3	6,4	0,542	1,880	0,491	7,196
	no	78	88,1	44	93,6				
<b>Cáncer sólido metastásico</b>	si	2	2,3	6	12,8	<b>0,020</b>	<b>0,157</b>	<b>0,030</b>	<b>0,812</b>
	no	87	97,7	41	87,2				
Tumor hematológico	si	4	5,1	4	8,3	0,452	0,524	0,125	2,196
	no	84	94,9	44	91,7				
<b>Cáncer</b>	si	6	6,7	10	20,8	<b>0,014</b>	<b>0,275</b>	<b>0,093</b>	<b>0,811</b>
	no	83	93,3	38	79,2				
<b>Comorbilidades mayores</b>	si	12	13,3	15	31,3	<b>0,012</b>	<b>0,338</b>	<b>0,143</b>	<b>0,801</b>
	no	78	86,7	33	68,8				
Embarazo	si	20	50	7	41,2	0,542	1,429	0,453	4,501
	no	20	50	10	58,8				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; IRC: insuficiencia renal crónica.

Al dividir las cargas virales en dos grupos, se observó, igualmente, que aquellos individuos que padecieron neumonía tenían más probabilidad de tener cargas virales bajas (<2000 cop/ml) que los que no la tuvieron (tabla 30).

Con el resto de complicaciones no se obtuvo ningún resultado significativo.

#### 4.1.7 Coinfecciones

Los pacientes coinfectados con algún microorganismo en el momento del diagnóstico de la gripe A H1N1 2009, tenían una mediana de carga viral tres logaritmos inferior a los que no estaban coinfectados ( $3,5 \times 10^3$  frente a  $2,5 \times 10^6$  cop/ml, respectivamente), aunque no se encontró significación estadística en esta asociación (Test de Mann-Whitney;  $p=0,231$ ), seguramente debido al bajo número de pacientes con gripe A coinfectados (10 en total).

**Tabla 29.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por complicaciones y test estadístico correspondiente.

Complicaciones	Resultado	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	P25	P75	p
Neumonía	si	49	30,6	1402,17	70,89	211055,14	<b>0,008</b>
	no	111	69,4	74998,22	869,78	643140,60	
Hipoxemia	si	7	5,1	869,78	36,04	340240,44	0,248
	no	131	94,9	59068,50	392,43	643140,60	
SDRA	si	1	0,7	869,78	869,78	869,78	0,578
	no	134	99,3	52795,39	392,43	643140,60	
Neumonía 2ª	si	0	0	0	0	0	NR
	no	135	100	46522,28	392,43	643140,60	
Shock	si	1	0,7	5010,04	5010,04	5010,04	0,785
	no	134	99,3	52795,39	392,43	643140,60	
Sepsis	si	2	1,5	2797,14	584,23	5010,04	0,441
	no	134	98,5	52795,39	392,43	643140,60	
Alteración función hepática	si	2	1,5	2513,15	16,26	5010,04	0,203
	no	134	98,5	52795,39	392,43	643140,60	
Fracaso renal agudo	si	3	2,2	460,14	3,73	5010,04	0,103
	no	132	97,8	60267,50	408,68	669780,05	
Alteraciones cardíacas	si	1	0,7	5010,04	5010,04	5010,04	0,785
	no	134	99,3	52795,39	392,43	643140,60	
CID	si	0	0	0	0	0	NR
	no	135	100	46522,28	392,43	643140,60	
Derrame pleural	si	0	0	0	0	0	NR
	no	135	100	46522,28	392,43	643140,60	
Neumotórax	si	1	0,7	28,39	28,39	28,39	0,191
	no	135	99,3	466522,28	392,43	574838,66	

Test estadístico utilizado: test de Mann-Whitney; CV: carga viral; P25: percentil 25; P75: percentil 75; NR: no realizado; SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo; CID: coagulación intravascular diseminada.

**Tabla 30.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por complicaciones y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml), y riesgos asociados.

		CV (cop/ml)							
		≥2000		<2000					
Complicaciones	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
Neumonía	si	23	23,2	26	42,7	0,010	0,407	0,204	0,812
	no	76	76,8	35	57,4				
Hipoxemia	si	3	3,4	4	8,2	0,245	0,392	0,084	1,830
	no	86	96,6	45	91,8				
SDRA	si	0	0	1	2,1	0,348	NR		
	no	88	100	46	97,9				
Neumonía 2ª	si	0	0	0	0	NR			
	no	0	0	47	100				
Shock	si	1	1,1	0	0	1	NR		
	no	87	98,9	47	100				
Sepsis	si	1	1,1	1	2,1	1	0,540	0,033	8,834
	no	87	98,9	47	97,9				
Alteración función hepática	si	1	1,1	1	2,1	1	0,540	0,033	8,834
	no	87	98,9	47	97,9				
Fracaso renal agudo	si	1	1,1	2	4,3	0,270	0,259	0,023	2,930
	no	87	98,9	45	95,7				
Alteraciones cardíacas	si	1	1,1	0	0	1	NR		
	no	87	98,9	47	100				
CID	si	0	0	0	0	NR			
	no	47	100	47	100				
Derrame pleural	si	0	0	0	0	NR			
	no	47	100	47	100				
Neumotórax	si	0	0	1	2,1	0,353	NR		
	no	88	100	47	97,9				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo; CID: coagulación intravascular diseminada. NR: no realizado.

El análisis cualitativo en dos grupos tampoco arrojó ningún dato significativo.

#### 4.1.8 Ingreso

Tanto los pacientes ingresados en los distintos Servicios, como aquellos que lo hicieron en la UCI y aquellos que fallecieron con una prueba de gripe A H1N1 2009 positiva, tuvieron valores de carga viral inferiores en un logaritmo al del resto de pacientes, aunque en ningún caso estos valores se pudieron constatar estadísticamente (tabla 31).

**Tabla 31.** Valores de mediana de carga viral (cop/ml) por ingreso y test estadístico correspondiente.

	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Mediana CV (cop/ml)	P25	P75	p
Ingreso	si	72	38,7	9470,24	345,68	506536,72	0,114
	no	114	61,3	72129,38	1294,90	1122692,80	
Ingreso UCI	si	4	2,2	2939,91	436,76	1713075,30	0,455
	no	182	97,8	46522,28	424,94	772334,49	
Exitus	si	2	1,1	2506,88	3,73	5010,04	0,177
	no	184	98,9	46522,28	442,54	904568,36	

Test estadístico utilizado: test de Mann-Whitney; CV: carga viral; P25: percentil 25; P75: percentil 75; UCI: unidad de cuidados intensivos.

Al aplicar el estudio sobre dos terciles de carga viral se observó, en pacientes ingresados, una mayor probabilidad de tener cargas virales menores de 2000 cop/ml ( $p=0,022$ ) (tabla 32).

**Tabla 32.** Casos de gripe A H1N1 2009 distribuidos por ingreso y rango (dos terciles) de cargas virales (cop/ml), y riesgos asociados.

		CV (cop/ml)							
		≥2000		<2000					
	SI/NO	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	p	OR	IC 95%	
Ingreso	si	40	32,8	32	50	0,022	0,488	0,263	0,906
	no	82	67,2	32	50				
Ingreso UCI	si	2	1,6	2	3,1	0,609	0,517	0,071	3,756
	no	120	98,4	62	96,9				
Exitus	si	1	0,8	1	1,6	1	0,521	0,032	8,464
	no	121	99,2	63	98,4				

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral; UCI: unidad de cuidados intensivos.

## 4.2 Análisis multivariante

El estudio multivariante se aplicó a aquellas variables que, en el análisis univariado, mostraron capacidad para modificar los valores de la carga viral.

La asociación del riesgo de estos factores para modificar la carga viral se realizó dividiendo las cargas virales en dos grupos diferenciados (tabla 33): aquellas cargas por encima de 2000 cop/ml (suma de las cargas entre 2000 y 110000 cop/ml y las mayores de 110000 cop/ml), a las que llamamos medio-altas, y las cargas por debajo de 2000 cop/ml, a las que se llamó cargas bajas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Los pacientes que padecían una inmunosupresión del tipo “otra inmunosupresión”, donde la mayoría de ellos eran trasplantados renales, tenían mayor probabilidad de tener cargas virales medio-altas ( $>2000$  cop/ml), que los que no tenían este antecedente personal ( $p=0,052$ ).

El malestar general, sin embargo, se dio mayoritariamente en aquellos pacientes con carga viral  $<2000$  cop/ml, es decir, aquellos pacientes que presentaban esta sintomatología en el momento del diagnóstico tenían mayor probabilidad de tener valores de carga viral  $<2000$  cop/ml ( $p=0,014$ ). Del mismo modo, aquellos pacientes que padecían alguna comorbilidad mayor en el momento del diagnóstico, tenían una mayor probabilidad de tener cargas virales bajas ( $p=0,005$ ).

El resto de factores en estudio fueron eliminados por el propio modelo.

Por tanto, en este estudio, los valores que se asociaron a tener cargas virales bajas fueron las comorbilidades mayores y el malestar general. Por el contrario, las cargas virales medio-altas se asociaron a padecer una inmunosupresión tipo “otra inmunosupresión”.

**Tabla 33.** Factores asociados a diferencias en la carga viral de las muestras de pacientes positivos para gripe A H1N1 2009. Modelo multivariante de regresión logística.

		Carga Viral (cop/ml)											
		≥2000		<2000									
Variables	Resultado	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	Pcruda	ORcruda	IC 95%		Pajustada	ORajustada	IC 95%	
Malestar general	si	13	14,8	16	34	0,009	0,336	0,145	0,780	0,014	0,327	0,134	0,797
	no	75	85,2	31	66								
Otra inmunosupresión	si	17	28,7	2	4,3	0,020	5,169	1,140	23,428	0,052	4,850	0,989	23,784
	no	74	81,3	45	95,7								
Comorbilidades mayores	si	12	13,3	15	31,3	0,012	0,338	0,143	0,801	0,005	0,243	0,091	0,651
	no	78	86,7	33	68,8								
Fiebre	si	108	74	64	85,3	0,054	0,488	0,233	1,023	0,223	0,567	0,228	1,411
	no	38	26	11	14,7								
Enfermedad crónica pulmón	si	44	41,5	12	24	0,033	2,247	1,056	4,783	0,234	1,769	0,691	4,527
	no	62	58,5	38	76								
Edad	<15	89	23,2	40	21,3	0,522	1			0,612	1		
	16_64	270	70,3	131	69,7	0,726	0,926	0,604	1,420	0,471	0,440	0,047	4,103
	>65	25	6,5	17	9	0,260	0,661	0,322	1,358	0,334	0,293	0,024	3,537

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%. En negrita, variables definitivas que acepta el modelo.



## 5. Estudio de factores predisponentes para padecer neumonía en pacientes con gripe A H1N1 2009.

La principal complicación que sufrieron los pacientes afectados de gripe A H1N1 2009 fue la neumonía, por lo que se escogió como principal variable para el estudio de los casos graves.

### 5.1 Análisis univariado

Se estudiaron todos aquellos factores que pudieran relacionarse con padecer una neumonía.

#### 5.1.1 Factores sociodemográficos

Al estudiar la edad y el sexo, se observó que ninguno de estos factores tenían importancia a la hora de desarrollar una neumonía (tabla 34).

**Tabla 34.** Distribución de casos de neumonía por edad y sexo, y riesgos asociados.

		Neumonía				p	OR	IC 95%	
		SI		NO					
		Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)				
Sexo	Hombre	28	57,1	52	46,8	0,230	1,510	0,768	2,980
	Mujer	21	42,9	59	53,2		1		
Edad	<16	3	6,2	7	6,3	0,797	1		
	16-64	38	79,2	92	82,9	0,713	0,735	0,142	3,797
	>65	7	14,6	12	10,8	0,501	0,708	0,259	1,936

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado y razón de verosimilitud; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

#### 5.1.2 Antecedentes personales

De entre todos los factores estudiados, fueron las comorbilidades mayores y las enfermedades neurológicas las que mostraron una relevancia mayor.

Los pacientes que presentaban como antecedente personal padecer una enfermedad neurológica, tenían 22 veces más de probabilidad de desarrollar una neumonía(  $p=0,004$ ).

Lo mismo ocurrió con los pacientes que padecían alguna de las llamadas comorbilidades mayores; en este grupo de individuos se observó una mayor tendencia a desarrollar neumonía ( $p=0,015$ ), si bien, el riesgo no fue tan elevado como en el caso de los pacientes con enfermedades neurológicas.

Los diabéticos también mostraron un mayor riesgo de padecer neumonía, aunque en esta ocasión la relación no llegó a mostrarse significativa ( $p=0,077$ ).

Las enfermedades crónicas del pulmón, los pacientes inmunosuprimidos y las embarazadas fueron grupos en los que el desarrollo de neumonías fue menor que en la población sin estos antecedentes aunque en ningún caso se alcanzó la significación estadística.

Por el contrario, pacientes con cáncer, principalmente tumores hematológicos, cardiopatas, hipertensos, fumadores, personas infectadas con virus de la hepatitis C, pacientes con arritmias, IRC y pacientes con enfermedades autoinmunes se mostraron como poblaciones proclives a padecer neumonía, aunque tampoco pudo demostrarse estadísticamente en ningún caso.

Todos los resultados pueden observarse en la tabla 35.

### **5.1.3 Cargas virales**

De modo similar al estudio de correlación realizado en el punto 4.1.6 de resultados, donde se analizaba la carga viral en función de las complicaciones, entre ellas la neumonía, aquí se estudió la neumonía en función de diferentes agrupaciones de la carga viral (tabla 36).

Al agrupar las cargas virales mayores de 2000 cop/ml y compararlas frente a aquellas con cargas menores a 2000 cop/ml, observamos que aquellos pacientes con cargas virales bajas ( $<2000$  cop/ml) tenían una mayor probabilidad de desarrollar una neumonía ( $p=0,010$ ). O lo que es lo mismo, los pacientes con cargas virales por encima de esta cifra estaban menos expuestos a padecer esta complicación ( $p=0,010$ ).

**Tabla 35.** Distribución de casos de neumonía por comorbilidades y riesgos asociados.

		Neumonía				p	OR	IC 95%	
		SI		NO					
		Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)				
Asma	si	3	10,5	26	23,4	0,182	0,426	0,118	1,535
	no	23	88,5	85	76,6		1		
EPOC	si	2	8	8	8	0,891	1,120	0,223	5,624
	no	23	92	103	92		1		
Enfermedad crónica pulmón	si	5	18,5	33	29,7	0,242	0,537	0,187	1,540
	no	22	81,5	78	70,3		1		
Quimioterapia	si	2	8,3	7	6,3	0,661	1,351	0,263	6,945
	no	22	91,7	104	93,7		1		
HIV/SIDA	si	4	16	10	9	0,289	1,924	0,551	6,723
	no	21	84	101	91		1		
Otra inmunosupresión	si	1	4,2	15	13,5	0,303	0,278	0,035	2,216
	no	23	95,8	96	86,5		1		
Inmunosupresión	si	7	28	32	28,8	0,934	0,960	0,366	2,520
	no	18	72	79	71,2		1		
<b>Enfermedad neurológica</b>	si	4	16,7	1	0,9	<b>0,004</b>	<b>22</b>	<b>2,360</b>	<b>207,170</b>
	no	20	83,3	110	99,1		1		
Isquemia coronaria	si	1	4,2	3	2,7	0,547	1,565	0,156	15,730
	no	23	95,8	108	97,3		1		
ICC	si	1	4,2	2	1,8	0,447	2,370	0,206	27,247
	no	23	95,8	109	98,2		1		
Valvulopatía	si	1	4,2	1	0,9	0,325	4,783	0,289	79,280
	no	23	95,8	110	99,1		1		
Enfermedad cardíaca	si	3	12,5	5	4,5	0,150	3,030	0,672	13,654
	no	21	87,5	106	95,5		1		

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; IRC: insuficiencia renal crónica; HTA: hipertensión arterial; VHC: virus hepatitis C; NR: no realizado.

**Tabla 35 (continuación).** Distribución de casos de neumonía por comorbilidades, y riesgos asociados.

		Neumonía				p	OR	IC 95%	
		SI		NO					
		Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)				
Cáncer sólido metastásico	si	1	4,2	6	5,4	1	0,761	0,087	6,630
	no	23	95,8	105	94,6		1		
Tumor hematológico	si	3	12,5	4	3,6	0,107	3,821	0,796	18,340
	no	21	87,5	107	96,4		1		
Cáncer	si	4	16,7	10	9	0,274	2,020	0,576	7,085
	no	20	83,3	101	91		1		
Comorbilidades mayores	si	9	37,5	15	13,5	0,015	3,840	1,428	10,329
	no	15	62,5	96	86,5		1		
Embarazo	si	3	37,5	21	45,7	0,669	0,714	0,152	3,347
	no	5	62,5	25	54,3		1		
Obesidad	si	0	0	3	2,7	1	NR		
	no	24	100	108	97,3				
HTA	si	6	25	17	15,3	0,246	1,843	0,640	5,312
	no	18	75	94	84,7		1		
Fumador	si	4	16,7	8	8	0,226	2,575	0,707	9,376
	no	20	83,3	103	92		1		
Diabetes tipo I/II	si	4	16,7	6	5,4	0,077	3,500	0,905	13,535
	no	20	83,3	105	94,6		1		
VHC	si	2	8,3	5	4,5	0,607	1,927	0,351	10,580
	no	22	91,7	106	95,5		1		
Arritmia	si	1	4,2	3	2,7	0,547	1,565	0,156	15,729
	no	23	95,8	108	97,3		1		
IRC	si	3	12,5	10	9	0,701	1,443	0,365	5
	no	21	87,5	101	91		1		
Abuso sustancias	si	2	8,3	4	3,6	0,289	2,432	0,419	14,111
	no	22	91,7	107	96,4		1		
Enfermedad autoinmune	si	1	4,2	2	1,8	0,447	2,370	0,206	27,247
	no	23	95,8	109	98,2		1		

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; IRC: insuficiencia renal crónica; HTA: hipertensión arterial; VHC: virus hepatitis C; NR: no realizado.

**Tabla 36.** Distribución de casos de neumonía por rangos de carga viral (cop/ml) y riesgos asociados.

		Neumonía				p	OR	IC 95%	
		SI		NO					
		Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)				
CV 3 terciles	<2000	26	53,1	35	31,5	0,035	1		
	2000-110000	9	18,3	29	26,2	0,288	0,418	0,169	1,030
	>110000	14	28,6	47	42,3	0,098	0,401	0,183	0,878
CV 2 terciles	<2000	26	53,1	35	31,5	0,010	2,455	1,232	4,890
	≥2000	23	46,9	76	68,5		1		
CV 2 terciles	<110000	35	71,4	64	57,6	0,098	1,836	0,889	3,791
	≥110000	14	28,6	47	42,4		1		
CV 2 terciles	≥2000	23	46,9	76	68,5	0,010	0,407	0,204	0,812
	<2000	26	53,1	35	31,5		1		
CV 2 terciles	≥110000	14	28,6	47	42,2	0,098	0,545	0,264	1,125
	<110000	35	71,4	64	57,6		1		

Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado y razón de verosimilitud; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral.

#### 5.1.4 Coinfecciones

Los pacientes que padecían una gripe A H1N1 2009 y que además tenían una coinfección por otro microorganismo al mismo tiempo, estaban 5,095 veces más expuestos a padecer una neumonía que aquellos pacientes sin coinfecciones (Test de chi-cuadrado;  $p=0,038$ ; OR:5,095; IC al 95%: 1,180-22).

#### 5.2 Análisis multivariante

Al realizar el análisis multivariado se incluyeron las variables que, en el análisis univariado, habían mostrado importancia estadística, y aquellas que, aun no siendo significativas, pudieran tener importancia a la hora de determinar factores de riesgo asociados a neumonía en pacientes infectados con el virus de la gripe A H1N1 2009.

Los resultados que se obtuvieron al aplicar este modelo en la población de estudio fueron los siguientes:

Los pacientes infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009, y que además padecían enfermedades neurológicas ó diabetes tipo I/II ó comorbilidades mayores, tenían mayor probabilidad de padecer una neumonía ( $p= 0,012$ ;  $0,038$  y  $0,020$  respectivamente) (tabla 37).

El estar coinfectado por otro microorganismo durante la infección por el virus de la gripe A H1N1 2009, también aumentó la probabilidad de padecer neumonía ( $p=0,020$ ).

Los pacientes con cargas virales bajas ( $<2000$  cop/ml), que mostraron una mayor tendencia a la neumonía en el análisis univariado, fueron, finalmente, eliminados por el modelo.

Por tanto, en la población de estudio, el sufrir una neumonía como complicación de una infección por virus de la gripe A H1N1 2009, se asoció a personas con antecedentes de comorbilidades mayores, enfermedades neurológicas, diabéticos y coinfectados con otro microorganismo. En cambio, no se asoció con diferencias en la carga viral.

**Tabla 37.** Factores asociados, en pacientes infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009, para padecer neumonía. Modelo multivariante de regresión logística.

		Neumonía											
		Si		NO		Pcruda	ORcruda	IC 95%		Pajustada	ORajustada	IC 95%	
Variables	Resultado	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)								
Enfermedad neurológica	si	4	16,7	1	0,9	0,004	22	2,360	207,170	0,012	20,268	1,917	214,274
	no	20	83,3	110	99,1								
Diabetes tipo I/II	si	4	16,7	6	5,4	0,077	3,500	0,905	13,535	0,038	4,635	1,088	19,735
	no	20	83,3	105	94,6								
Comorbilidades mayores	si	9	37,5	15	13,5	0,015	3,840	1,428	10,329	0,020	3,697	1,232	11,095
	no	15	62,5	96	86,5								
Coinfección	si	4	16	4	4,6	0,038	5,095	1,180	22	0,020	6,840	1,352	34,609
	no	21	84	107	96,4								
CV 2 terciles	>2000	23	46,9	76	68,5	0,010	0,407	0,204	0,812	0,236	0,531	0,186	1,512
	<2000	26	53,1	35	31,5								

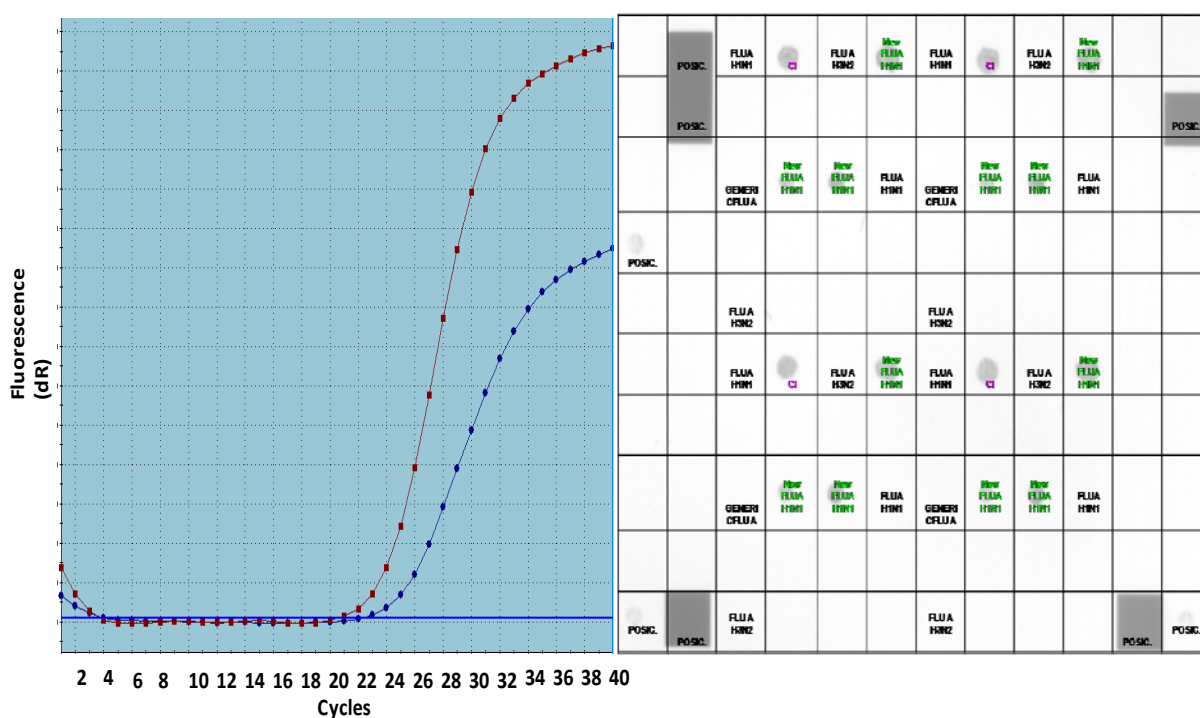
Test estadístico utilizado: test de chi-cuadrado; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; CV: carga viral (cop/ml). En negrita, variables definitivas que acepta el modelo.

## 6. Utilidad de diversas técnicas diagnósticas para detección de gripe A H1N1 2009

### 6.1 Técnica de Arrays (*CLART<sup>®</sup> Fluavir*)

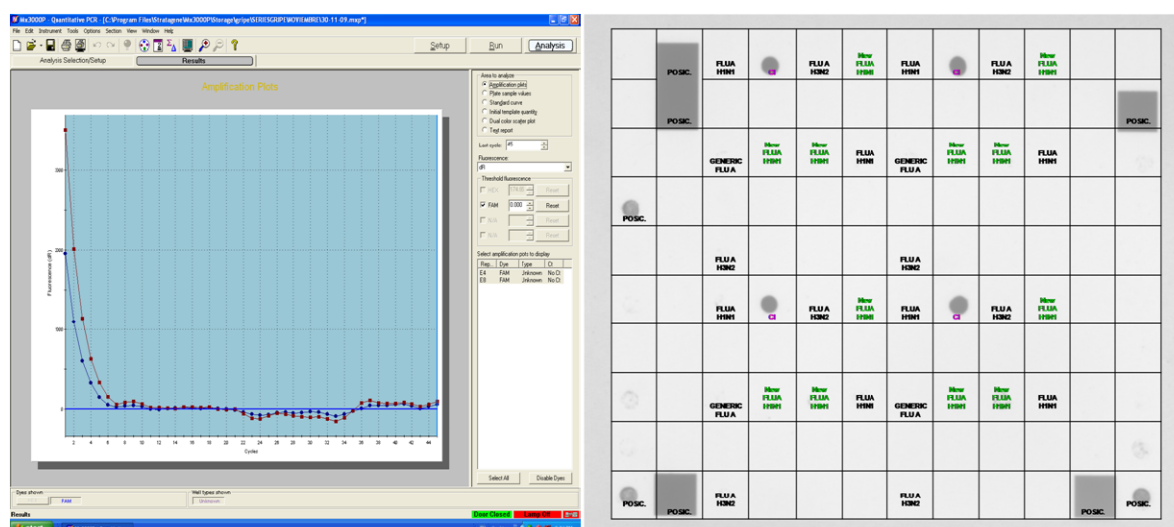
De las 79 muestras analizadas, 62 tuvieron un resultado coincidente con el método de referencia: 31 muestras fueron positivas por ambos métodos (figura 19) y 31 negativas (figura 20).

Diecisiete muestras tuvieron resultados discrepantes: 5 muestras fueron negativas por arrays y positivas por el método de referencia (tabla 38) y 12 muestras fueron positivas por arrays y negativas por PCR a tiempo real. Ninguna muestra resultó positiva para otros subtipos de gripe A.



**Figura 19.** Visualización de muestras positivas para gripe A H1N1 2009; izquierda, método de RT-PCR (PCR a tiempo real); derecha, método de *CLART<sup>®</sup> Fluavir* (técnica de arrays).





**Figura 20.** Visualización de muestras negativas para gripe A H1N1 2009; izquierda, método de RT-PCR (PCR a tiempo real); derecha, método de *CLART® Fluavir* (técnica de arrays)

Las muestras con resultado positivo por las dos técnicas abarcaban un rango de carga comprendido entre  $3,07 \times 10^1$  y  $1,3 \times 10^8$  cop/ml.

Las muestras positivas por PCR y negativas por la técnica de arrays tenían valores de carga viral entre  $1,44 \times 10^1$  y  $1,8 \times 10^2$  cop/ml.

El mínimo valor de carga viral que se detectó por esta técnica fue de  $3,07 \times 10^1$  cop/ml.

**Tabla 38.** Resultados de comparativa entre técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y técnica en estudio (*CLART® Fluavir*) para gripe A H1N1 2009.

CLART® Fluavir	PCR+		PCR-		Total	
	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)
Positivo	31	86,1	12	27,9	43	54,4
Negativo	5	13,9	31	72,1	36	45,6
Total	36	100	43	100	79	100

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

El acuerdo absoluto entre estas dos técnicas fue de 0,7721 (77,2%).

La probabilidad de que con esta técnica detectemos a un paciente con gripe A H1N1 2009, siendo positivo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 86,11% (IC al 95%: 73,43-98,80%).

La probabilidad de que con esta técnica obtengamos un resultado negativo para gripe A H1N1 2009, siendo el paciente negativo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 72,09% (IC al 95%: 57,52-86,66%).

## 6.2 Técnica de PCR clásica (*Speed Oligo*®)

De las 8 muestras positivas previas por RT-PCR a tiempo real, 6 resultaron positivas por esta técnica, aquellas comprendidas entre los valores de carga viral de  $1,6 \times 10^2$  a  $5,5 \times 10^6$  cop/ml.

Las 4 muestras negativas se correspondieron con las 2 muestras negativas por RT-PCR a tiempo real y las 2 con cargas virales de  $3,9 \times 10^2$  y 79,8 cop/ml respectivamente (tabla 39).

**Tabla 39.** Resultado de las muestras seleccionadas y sus cargas virales correspondientes.

Muestra	Resultado RT-PCR	CV calculada (cop/ml)	Resultado Speed Oligo®
1	Positivo	$2,5 \times 10^6$	<b>Positivo</b>
2	Positivo	$1,6 \times 10^2$	<b>Positivo</b>
3	Positivo	$2,4 \times 10^3$	<b>Positivo</b>
4	Positivo	$1,9 \times 10^3$	<b>Positivo</b>
5	Positivo	$3,9 \times 10^2$	Negativo
6	Positivo	$3,2 \times 10^6$	<b>Positivo</b>
7	Positivo	$5,5 \times 10^6$	<b>Positivo</b>
8	Positivo	79,8	Negativo
9	Negativo	0	Negativo
10	Negativo	0	Negativo

CV: carga viral; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción en reverso.

El mínimo valor de carga viral que se detectó con esta técnica fue de  $1,6 \times 10^2$  cop/ml.

El acuerdo absoluto entre estas dos técnicas fue de 0,80 (80%).

La probabilidad de que con esta técnica detectemos a un paciente con gripe A H1N1 2009, siendo positivo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 75% (IC al 95%: 68,57-81,43%).

La probabilidad de que con esta técnica obtengamos un resultado negativo para gripe A H1N1 2009, siendo el paciente negativo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 100% (IC:75-100%).

### **6.3 Test rápidos inmunocromatográficos**

#### **6.3.1 Clearview® Exact Influenza A & B**

De las 22 muestras a las que se les realizó la prueba, solo 3 fueron positivas y el resto (19 muestras) fueron negativas (figura 21).

Todas las muestras que fueron negativas por el método de referencia, lo fueron por este test inmunocromatográfico. De las muestras que fueron positivas por la técnica de referencia, solo 3 lo fueron también por este test (tabla 40). Los valores de carga viral de estas 3 muestras fueron, en dos de ellas de  $1,03 \times 10^5$  cop/ml, y en la otra de  $2,5 \times 10^6$  cop/ml.

Las 11 muestras positivas por RT-PCR, pero negativas por esta técnica, se encontraban entre un rango de cargas virales de 16,3 cop/ml a  $2,3 \times 10^5$  cop/ml.

El mínimo valor de carga viral que se detectó por esta técnica fue de  $1,03 \times 10^5$ .

El acuerdo absoluto entre las dos técnicas fue de 0,50 (50%).

La probabilidad de que con esta técnica detectemos a un paciente con gripe A H1N1 2009, siendo positivo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 21,43% (IC al 95%: 0,00-46,49).

La probabilidad de que con esta técnica obtengamos un resultado negativo para gripe A H1N1 2009, siendo el paciente negativo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 100% (IC al 95%: 93,75-100).

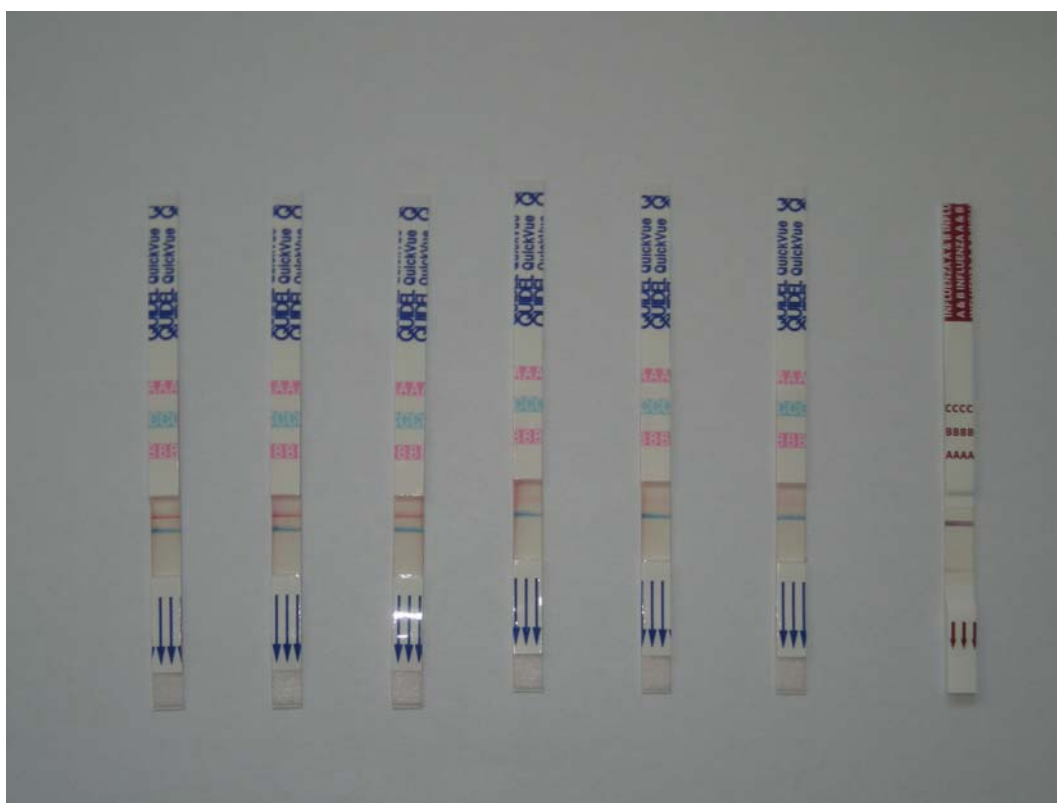
**Tabla 40.** Resultados de comparativa entre técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y técnica en estudio (*Clearview® Exact Influenza A & B*).

Clearview®	PCR+		PCR-		Total	
	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)
Positivo	3	100	0	0	3	100
Negativo	11	57,9	8	42,1	19	100
Total	14	63,6	8	36,4	22	100

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

### 6.3.2 Quick Vue® Influenza A+B

De las 22 muestras analizadas, 9 fueron positivas para gripe A por esta técnica (figura 21).



**Figura 21.** A la izquierda 6 determinaciones del test *Quick Vue® Influenza A+B* (en azul, las tres primeras por la izquierda positivas para gripe A). A la derecha (rojo) test positivo para gripe A del método *Clearview® Exact Influenza A & B*.

Todas las muestras que fueron negativas por el método de referencia, lo fueron por este test inmunocromatográfico. De las muestras que fueron positivas por la técnica de referencia, solo 9 lo fueron también por este test

(tabla 41). En concreto, aquellas con valores de carga viral comprendidas entre  $2,4 \times 10^2$  y  $2,5 \times 10^6$  cop/ml. El resto fueron negativas, incluyendo dos muestras con una carga viral de  $3,9 \times 10^3$  cop/ml y otra con  $6,3 \times 10^2$  cop/ml.

Las 5 muestras positivas por RT-PCR, pero negativas por esta técnica, se encontraban entre un rango de cargas virales de 16,3 cop/ml a  $3,9 \times 10^3$  cop/ml.

El mínimo valor de carga viral que se detectó por esta técnica fue de  $2,4 \times 10^2$  cop/ml.

El acuerdo absoluto entre las dos técnicas fue de 0,7727 (77,3%).

La probabilidad de que con esta técnica detectemos a un paciente con gripe A H1N1 2009, siendo positivo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 64,29% (IC al 95%: 35,61-92,96).

La probabilidad de que con esta técnica obtengamos un resultado negativo para gripe A H1N1 2009, siendo el paciente negativo por la técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real), fue del 100% (IC al 95%: 93,75-100).

**Tabla 41.** Resultados de comparativa entre técnica de referencia (RT-PCR a tiempo real) y técnica en estudio (*Quick Vue® Influenza A+B*).

Quick Vue®	PCR+		PCR-		Total	
	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)	Nº casos	Porcentaje (%)
Positivo	9	100	0	0	9	100
Negativo	5	38,5	8	61,5	13	100
Total	14	63,6	8	36,4	22	100

PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

## 7. Estudio de virus respiratorios

Se realizó la determinación de virus respiratorios en un total de 156 muestras, distribuidas en 75 pacientes con prueba previa positiva por RT-PCR para virus de la gripe A H1N1 2009 y 81 pacientes con esta misma prueba negativa.

En los pacientes PCR positivos sólo pudimos identificar algún virus en 28 (37,3%) de las muestras investigadas, mientras en el grupo de los negativos obtuvimos 30 (37%). Los resultados pueden verse en la tabla 42.

**Tabla 42.** Distribución de resultados para la prueba de arrays de virus respiratorios según el grupo estudiado.

	Resultado	PCR+	Porcentaje (%)	PCR-	Porcentaje (%)	Total	Porcentaje (%)
Arrays virus respiratorios	Positivo	28	37,3	30	37	58	37,2
	Negativo	47	62,7	51	63	98	62,8
	Total	75	100	81	100	156	100

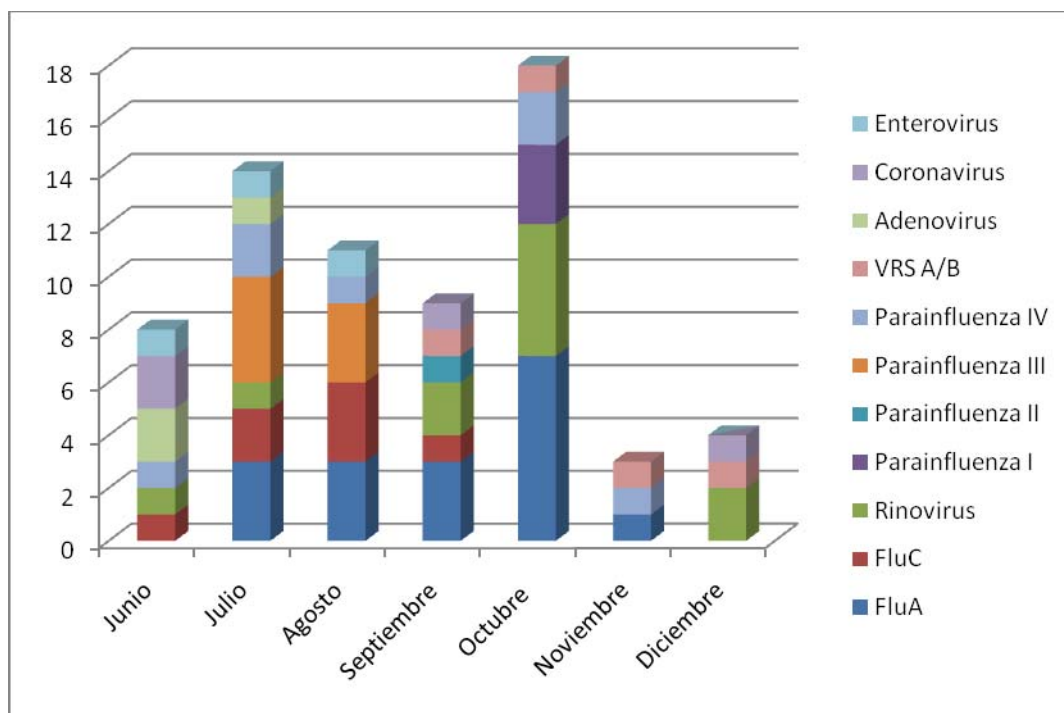
PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia.

Los virus que mayoritariamente se detectaron fueron los de la influenza tipo A (no incluido el H1N1 2009), seguidos de los rinovirus, virus de la parainfluenza (incluyendo los cuatro grupos: I, II, III y IV) y virus de la influenza tipo C.

Durante los primeros meses de pandemia por el virus H1N1 2009, la distribución de los diferentes virus pareció muy heterogénea, si bien durante los meses de Julio y Agosto predominaron los virus de la influenza (A y C principalmente) y de la parainfluenza. A partir de los meses de Septiembre y Octubre, cuando se produce el mayor pico de incidencia de gripe A H1N1 2009 en España, los virus que más detectamos fueron los otros subtipos de la influenza A y los rinovirus (figura 22).

### 7.1 Pacientes con prueba positiva para gripe A H1N1 2009

En las 28 muestras que resultaron positivas se detectaron 31 virus, apareciendo en 3 de ellas una doble coinfección vírica. Los virus que mayoritariamente se detectaron fueron los virus de la influenza A (no H1N1 2009), en 16 ocasiones (51,6%), seguidos de los de la influenza C y los rinovirus con 4 (tabla 43). Por tanto, se observaron 16 coinfecciones de gripe A H1N1 2009 con otros virus de la gripe A.



**Figura 22.** Distribución de casos de virus detectados por meses

**Tabla 43.** Virus identificados con la técnica de arrays de virus respiratorios en pacientes con prueba para gripe A H1N1 2009 positiva.

Virus	PCR+	
	Nº casos	Porcentaje (%)
FluA	16	51,6
FluC	4	12,9
Parainfluenza I	1	3,2
Parainfluenza II	0	0
Parainfluenza III	1	3,2
Parainfluenza IV	2	6,4
Rinovirus	4	12,9
VRS A/B	3	9,6
Adenovirus	0	0
Coronavirus	0	0
Enterovirus	0	0
Total	31	100

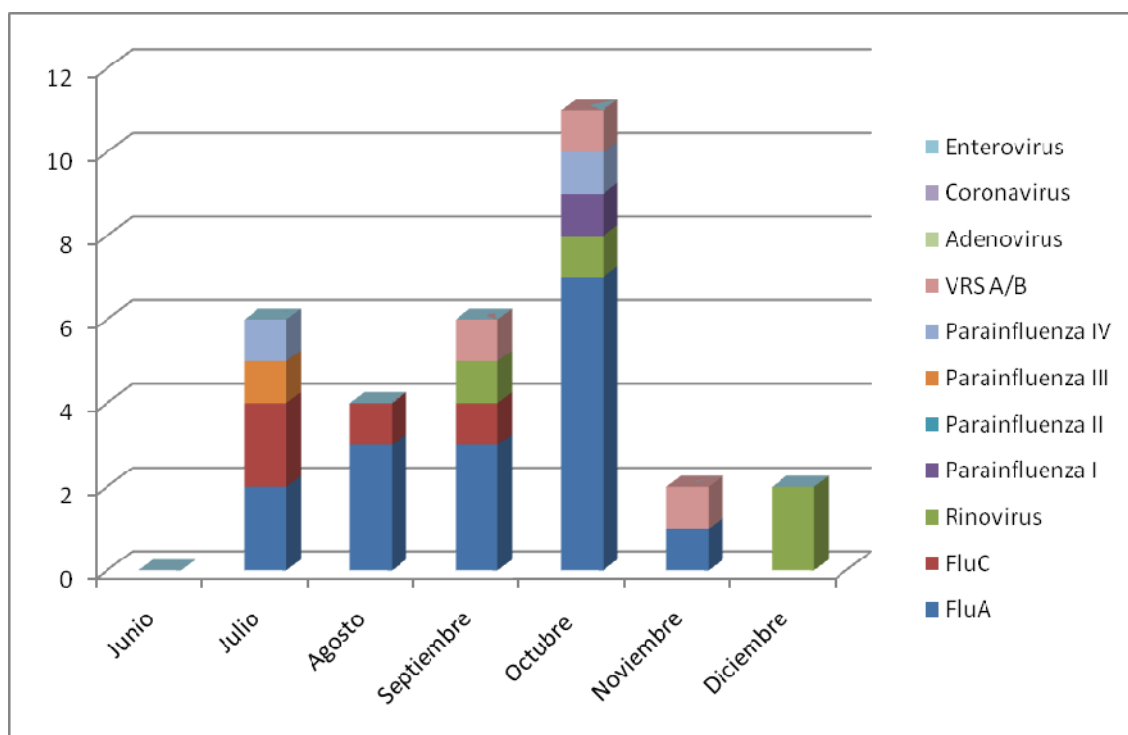
PCR+: pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; FluA: virus de la influenza A; FluC: virus de la influenza C; VRS: virus respiratorio sincitial.

En tres muestras se encontraron dos virus simultáneamente acompañando al de la gripe A H1N1 2009. En una de ellas se identificó algún

virus de la influenza A acompañado del virus respiratorio sincitial A ó B (VRS A/B), y en otra acompañado del virus de la parainfluenza I. En la tercera muestra en cuestión se detectó al virus de la influenza C junto con el VRS A/B. Ninguno de estos pacientes presentó signos de neumonía.

Sólo 1 de los 28 pacientes con virus detectables fue diagnosticado de neumonía, uno de los que poseía una coinfección con algún virus de la influenza tipo A.

Al analizar estos datos por meses, se observó que los virus de la influenza tipo C aparecían de forma importante, junto con otros virus de la gripe A, como principales coinfectantes de los cuadros de gripe A H1N1 2009 en los meses previos al pico de mayor incidencia. A partir de Septiembre-Octubre, los virus influenza tipo A se mantuvieron como los mayoritarios, apareciendo rinovirus, virus de la parainfluenza y virus respiratorio sincitial. En Diciembre se dejaron de detectar virus de la influenza (figura 23).



**Figura 23.** Distribución de casos de virus detectados por meses en pacientes con gripe A H1N1 2009.



## 7.2 Pacientes con prueba negativa para gripe A H1N1 2009

En las 30 muestras que resultaron positivas se detectaron 36 virus diferentes, apareciendo en 6 de ellas una doble coinfección vírica. Los virus que mayoritariamente se encontraron en estas muestras fueron los virus de la parainfluenza (39,2%), principalmente los tipos III y IV, seguidos por los rinovirus (19,6%), y los coronavirus (11,2%). Los virus de la influenza apenas alcanzaron un 11,2% del total (entre tipos A y C). En la tabla 44 pueden observarse todos los resultados.

**Tabla 44.** Virus identificados con la técnica de arrays de virus respiratorios en pacientes con prueba para gripe A H1N1 2009 negativa.

Virus	PCR-	
	Nº casos	Porcentaje (%)
FluA	1	2,8
FluC	3	8,4
Parainfluenza I	2	5,6
Parainfluenza II	1	2,8
Parainfluenza III	6	16,8
Parainfluenza IV	5	14
Rinovirus	7	19,6
VRS A/B	1	2,8
Adenovirus	3	8,4
Coronavirus	4	11,2
Enterovirus	3	8,4
Total	36	100

PCR-: pacientes negativos para gripe A H1N1 2009 por técnica de referencia; FluA: virus de la influenza A; FluC: virus de la influenza C; VRS: virus respiratorio sincitial.

En 6 de los pacientes se detectó la coexistencia de 2 virus simultáneamente. Solo a uno de estos pacientes se le diagnosticó neumonía, en concreto a aquel en cuya muestra se habían detectado coronavirus y VRS A/B. El resto de dobles infecciones se detallan en la tabla 45.

A 5 de los 30 pacientes con virus detectables se les diagnosticó neumonía. Uno de ellos fue el de la doble infección mencionada anteriormente.

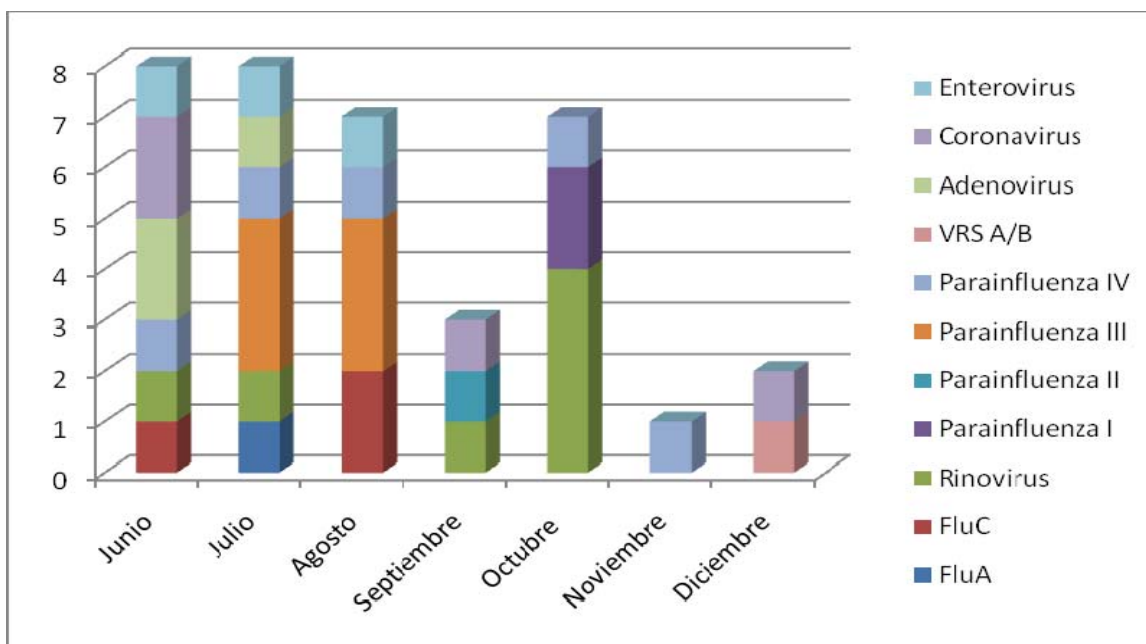
En los otros 4 se detectaron, en 2 ocasiones el virus de la parainfluenza IV, y en una los virus de la parainfluenza III y el virus de la gripe C.

**Tabla 45.** Dobles infecciones víricas detectadas en pacientes con prueba para gripe A H1N1 2009 negativa, desarrollo de neumonía e ingreso.

Muestra	Virus 1	Virus 2	Neumonía	Ingreso
1	FluA	Parainfluenza III	no	no
2	Enterovirus	Parainfluenza III	no	si
3	Rinovirus	Parainfluenza III	no	si
4	FluC	Parainfluenza III	no	no
5	VRS A/B	Coronavirus	si	no
6	Rinovirus	Parainfluenza I	no	si

FluC: virus de la influenza C; VRS: virus respiratorio sincitial.

Al analizar los datos obtenidos por meses, pudo observarse que durante el mes de Junio existió una gran heterogeneidad en la etiología de las infecciones. Los meses de Julio y Agosto parecen estar dominados por los virus de la parainfluenza (especialmente el tipo III) y los virus de la gripe C. A partir de Septiembre-Octubre son mayoritarios los rinovirus y los virus parainfluenza (tipos I, II y IV principalmente) (figura 24). Adenovirus, coronavirus y enterovirus aparecieron entre Julio y Agosto, desapareciendo en los meses posteriores.



**Figura 24.** Distribución de casos de virus detectados por meses en pacientes con gripe A H1N1 2009 negativa.



## **Discusión**



## 1. Descriptivo general

La aparición de una nueva cepa de gripe A en un periodo de tiempo atípico y su rápida expansión por todo el mundo provocó un importante alarma tanto social como científica. Desde la detección del primer caso se han realizado numerosos esfuerzos por avanzar en el conocimiento de este virus y de las infecciones que produce. En este contexto, el trabajo desarrollado en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos ha tratado de contribuir al conocimiento de la pandemia analizando las características que pueden favorecer la infección por el nuevo virus y determinando cuáles de estas características guardan relación con la gravedad de los síntomas.

Durante el transcurso de la pandemia y, sobre todo en los momentos iniciales, el número de solicitudes recibidas en todos los laboratorios en los que se realizaba la determinación de la gripe A H1N1 2009 fue elevado ya que, en el intento de controlar la diseminación de la enfermedad, cualquier paciente con clínica respiratoria era considerado como sospechoso de padecer gripe A. Sin embargo, y como ha podido comprobarse con posterioridad, el nuevo virus solo fue responsable de una parte de los casos sospechosos. En este sentido, en el estudio que hemos llevado a cabo, solo el 29% de las muestras procesadas fueron positivas para gripe A H1N1 2009 (611/2111). Este porcentaje de positividad fue ligeramente inferior al encontrado en otros estudios, donde se refieren porcentajes cercanos al 35% (104-106) o, incluso, superiores al 50% (107). Esta heterogeneidad se explica debido al diferente trato que se le dió a la pandemia y al modo en que se abordó en las diferentes regiones y países.

Las muestras nasofaríngeas fueron las que representaron el mayor porcentaje de positivos de entre todas las muestras procesadas (59,4%). Este tipo de muestras son las recomendadas para la determinación de gripe A H1N1 2009 (86), por lo que fueron las que mayoritariamente se mandaron a nuestro laboratorio, y por tanto las que tuvieron un mayor porcentaje de positividad.

El tipo de cuadros que provocan los virus de la influenza, y por extensión el virus de la gripe A H1N1 2009, son mayoritariamente agudos, con fiebre, malestar y quebrantamiento generalizado. Es por ello que son patologías

proclives para acudir a Servicios de Urgencias de hospitales sin pasar en muchos casos por atención primaria. Por ello en nuestro estudio, los más demandantes para realizar la prueba de detección de la gripe A H1N1 2009 fueron los Servicios de Urgencias de los diferentes Hospitales a los que se les dio servicio (58% del total de muestras procesadas). Las muestras solicitadas por Servicios de Pediatría y Urgencias de Pediatrías se encuentran en mucha menor proporción debido fundamentalmente a dos cuestiones: 1. Sobre el mes de Octubre-Noviembre del año 2009 el Hospital Clínico San Carlos comenzó unas obras de remodelación, que tuvieron como consecuencia el traslado del Servicio de Pediatría y sus Urgencias a otro Hospital; 2. Muchos Hospitales de los que se recibieron muestras tienen unido en un mismo Servicio de Urgencias tanto las adultas como las pediátricas.

El pico máximo de incidencia se produjo entre las semanas 42 a la 47 del año 2009, coincidiendo con datos de otros estudios españoles (107) y de otros países del hemisferio Norte (108-110).

La proporción entre pacientes positivos fue ligeramente superior en hombres que en mujeres (53,2% versus 46,8%), aunque hay que tener en cuenta que el número de muestras totales procesadas fue superior en los varones (100 muestras más aproximadamente). No existen datos uniformes en la literatura respecto de la incidencia por sexos de la gripe A H1N1 2009. En algunas publicaciones, al igual que sucede en nuestro estudio, el porcentaje en varones es mayor (57;107;111). Sin embargo, existen otros trabajos en los que sucede a la inversa (porcentaje de mujeres superior al de hombres) (104). Esta tendencia hacia las mujeres se observa sobretodo en estudios realizados en pacientes con enfermedad severa (54;112). Hay, no obstante, numerosos trabajos en los que no aparece ninguna diferencia entre uno u otro sexo (113-119). Estas discrepancias entre las distintas publicaciones parecen estar provocadas por las características sociodemográficas de cada país o región, y por otros factores como la edad de los pacientes (120).

La población más afectada por la gripe A H1N1 2009 ha sido la de los adultos jóvenes. En concreto, en nuestro estudio la media de edad de los afectados fue de 33,11 años. Al principio de la pandemia los datos recogidos

mostraban una afectación superior en grupos de edad comprendidos entre los 5-24 años (38;121). Posteriormente y según se fue extendiendo la pandemia, la edad de la población afectada, fue aumentando (generalmente menores de 60 años), aunque con una clara tendencia a población joven y niños (34;38;122). Algunos autores coinciden en la edad media de los afectados con nuestros datos, situándola en 36 años aproximadamente (41;57;107). Otros lo sitúan cercana a los 40 años (42;104;112;123). Sin embargo, Yu *et al.* en un estudio realizado en China (111), sitúan la media de edad de los afectados en 20 años de edad. Según nuestros datos, el 70% de los pacientes con diagnóstico de gripe A se situaban en edades comprendidas entre los 16-64 años. El 22,6% de los casos poseían edades por debajo de los 15 años y solo el 7,3% de los casos correspondieron a personas mayores de 65 años. Por tanto, puede considerarse que lo sucedido en nuestra población de estudio (92,6% de casos en menores de 65 años) es un reflejo de lo acontecido en el resto de países.

Desde el principio de la pandemia se observó que la sintomatología con que cursaba la enfermedad era muy parecida a la de otros episodios epidémicos gripales. En nuestro estudio, la fiebre y la tos fueron los síntomas más prevalentes entre la población afectada, seguidos de la disnea, mialgias y malestar general. Los porcentajes de pacientes que poseían fiebre en el momento del diagnóstico de gripe A H1N1 2009 fluctúan entre el 85-96%, según las diversas publicaciones existentes (38;52;56;57;64-66;97;107;124;125), situando nuestro porcentaje (75%) por debajo de ellas. Sin embargo, los datos de pacientes con tos (60%), si concuerdan con los datos de la bibliografía (entre el 31-94%). El resto de síntomas también aparecieron en menor porcentaje en nuestro estudio que en los que se recogen en la literatura, muy posiblemente debido a la falta de datos de muchos de nuestros pacientes. También se evidenció una menor prevalencia de alteraciones gastrointestinales (vómitos y diarrea), debida principalmente a que estas fueron más comunes, durante el periodo pandémico, en niños menores de 5 años (38), población de la que nosotros poseíamos pocas muestras.

Las distintas comorbilidades que presentan los pacientes con gripe A H1N1 2009 parece que juegan un papel esencial para comprender las características de la infección. En nuestro estudio, las comorbilidades que más



padecieron los pacientes infectados con el virus fueron las enfermedades crónicas pulmonares (35,9% de los afectados), especialmente el asma (27,5%), y las inmunosupresiones (32,2%). Un 19,6% de los pacientes con prueba positiva padecían una comorbilidad mayor, y sólo un 2,9% eran obesos. El porcentaje de mujeres embarazadas con gripe A H1N1 2009 fue del 1,9% respecto del total de la población, representando el 47,4% del total de mujeres fértiles con prueba positiva. Al comparar estos resultados con estudios en población general, observamos que se mantienen estos patrones en cuanto a las comorbilidades que mayoritariamente aparecen, aunque con porcentajes ligeramente inferiores a los nuestros (104;107;111;123). Sin embargo, el porcentaje de mujeres embarazadas en nuestro estudio fue inferior al aparecido en estas publicaciones, donde los rangos oscilan entre el 5-12% de la población total en estudio.

En estudios realizados en pacientes con enfermedad severa (neumonía, ingreso en UCI ó muertes) observamos diferencias respecto a nuestros datos (41;42;54;57). Así, si bien los datos de pacientes afectos de enfermedades crónicas del pulmón eran similares, no sucedió lo mismo con el porcentaje de pacientes obesos y con alteraciones metabólicas (fundamentalmente diabéticos tipo I/II). La bibliografía refiere un porcentaje mayor (obesos entre un 7,8% a un 33,3% y diabéticos entre 9,8% y 20,8%) que el que refleja nuestro análisis (obesos 2,9% y diabéticos 8,1%). También se observan diferencias en cuanto a la prevalencia de enfermedad cardíaca y enfermedades neurológicas que es superior en las publicaciones mencionadas. Por el contrario, el porcentaje de pacientes inmunosuprimidos y con cáncer en enfermos graves es menor en estos estudios que en el nuestro. Estas diferencias pueden deberse al tamaño muestral; la población analizada en el Hospital Clínico San Carlos incluía un número reducido de casos de enfermedad severa. Un estudio canadiense en enfermos ingresados en UCI (54), sitúa el porcentaje de personas afectadas por el virus que padecen una comorbilidad mayor en un 30%, frente al 19,6% de nuestros pacientes.

Si comparamos nuestros datos con los de estudios en población pediátrica, observamos que también en los niños, las enfermedades crónicas del pulmón son las mayoritarias en cuanto a prevalencia, incluso con

porcentajes superiores a los de población adulta (52;106;126;127). Según otros autores, las enfermedades neurológicas y la obesidad también son comorbilidades comunes en niños (52;128).

La neumonía ha sido la principal complicación de la enfermedad producida por el virus de la gripe A H1N1 2009 (43;52;54;97;129), y en este sentido un 30,6% de nuestros pacientes con prueba positiva desarrolló esta complicación. Este porcentaje es similar al de otros autores (104;112), aunque hemos de tener en cuenta que en poblaciones con enfermedad severa puede aumentar hasta un 85% (57). Al principio de la pandemia, los primeros casos de infección hablaban de porcentajes de en torno al 50% (38). En un estudio realizado en población pediátrica, este valor se sitúa en un 15,4% de los niños infectados (106).

Debido a las especiales características de la pandemia, y a cómo acontecieron los hechos, resulta difícil establecer una tasa de ingreso fiable en población infectada con el virus. En nuestro Hospital, inicialmente se realizó un protocolo de actuación y de hospitalización que fue adaptándose conforme evolucionaba la pandemia; por ello es muy difícil hablar de hospitalización debida al virus de la gripe A H1N1 2009 en nuestro entorno, y, simplemente podemos aportar los datos de que se dispone. En este sentido puede observarse una gran disparidad de valores de unas regiones a otras. Así, hay datos que hablan de porcentajes de hospitalización en pacientes con prueba positiva del 2-7% (34;130), mientras que otros estudios mencionan porcentajes mucho mayores (77%) (111). En Canadá, sobre un total de 7107 casos, un 20,3% precisaron hospitalización (54).

Datos más fiables son los que se extraen de los pacientes que precisaron ingreso en Servicios de Cuidados Intensivos. Diversos autores cifran estos valores entre el 6-31% (51-55). En nuestro estudio, el porcentaje de pacientes que precisaron UCI fue del 2,2%, en parte debido a la falta de datos de otros hospitales, y en parte también a que en nuestro hospital hubo muy pocos casos graves. La tasa de mortalidad de pacientes infectados con el virus y que ingresaron en la unidad de cuidados intensivos se ha situado en rangos del 14-46% (41;51-55). En nuestro hospital, sólo se produjeron dos muertes

atribuibles a la infección por gripe A H1N1 2009 (1,1% de la población afectada), aunque una vez más la falta de datos de otros hospitales nos hace sospechar que este dato pudiera ser más elevado.

Las coinfecciones bacterianas secundarias a una infección por virus de la gripe A se han observado a lo largo de otras pandemias de gripe anteriores a ésta (37;131-133). Los porcentajes de coinfecciones bacterianas en pacientes infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009 son muy dispares de unos estudios a otros. Varían de un 6-7% en estudios en población general (104;123), a intervalos que oscilan entre el 22-43% en pacientes ingresados en UCI ó en fallecimientos atribuibles al virus (54;128;129). De los 10 pacientes positivos para gripe A H1N1 2009 con coinfecciones encontrados en este trabajo, la mitad fueron ingresados (3 de ellos en UCI) y 4 poseían una neumonía como complicación de su cuadro gripal. También en niños los intervalos de coinfección varían considerablemente desde un 2% (106) a un 13,7% (124). En un estudio de pacientes infectados por VIH con gripe A H1N1 2009, el 11,5 % tenían una coinfección bacteriana simultáneamente (123). En nuestro estudio, el 5,4% de los pacientes con gripe A H1N1 2009 (sobre 187 pacientes) poseían una coinfección bacteriana por algún otro microorganismo(no incluidos virus).

*S. pneumoniae* es el microorganismo más encontrado en los casos de coinfecciones bacterianas, no solo en nuestros datos, sino en la mayoría de los estudios realizados (104;123;124;128;129). El sinergismo entre los virus de la gripe A y el neumococo es un hecho que se conoce con anterioridad. Madhi *et al.* (134) ya demostraron que la vacunación frente al *S. pneumoniae* reducía la frecuencia de neumonías asociadas a los virus de la gripe A.

Por detrás del neumococo se sitúan en orden de importancia *S. aureus* y *S. pyogenes* (128;129). En un estudio en pacientes en UCI, Kumar *et al.* (54) observaron más casos de neumonía post-ingreso por *S. aureus* que por *S. pneumoniae* (18 casos frente a 5). Palacios *et al.* encontraron una mayor proporción de coinfecciones por *H. influenzae* que por *S. pneumoniae* en una serie de aproximadamente 200 casos de gripe A H1N1 2009, aunque el porcentaje de coinfecciones por neumococo fue mayor en pacientes con

enfermedad grave y el de *H. influenzae* mayor en enfermos con enfermedad leve (135). En nuestro estudio no encontramos ningún paciente positivo para gripe A que además estuviera infectado por *H. influenzae*.

## **2. Factores predisponentes para padecer gripe A H1N1 2009**

### **2.1 Población general**

Desde el principio de la pandemia, la edad se ha mostrado como un factor determinante para establecer grupos de riesgo. A diferencia de otras epidemias gripales, han sido los niños y los adultos jóvenes los más afectados por el virus (34;38;121;122). En nuestro estudio, la edad se mostró como un factor significativo para determinar una mayor propensión a padecer la infección en determinados grupos de edad ( $p < 0,001$ ). La mayor incidencia de casos la encontramos en los pacientes comprendidos entre los 16 y los 64 años, seguido de los niños entre 5 y 15. Por el contrario, en personas mayores de 65 años la incidencia fue mucho menor, de tal forma que al realizar el modelo de regresión logística multivariante, observamos una asociación entre tener una edad superior a los 65 años y estar protegido de padecer una gripe A H1N1 2009 ( $p: 0,001$ ; OR: 0,369; IC 95%: 0,206-0,660). Esta asociación ya se ha establecido en otros estudios (58;136;137), en los que se apunta a que es la inmunidad previa adquirida por estas personas en epidemias precedentes de virus de la gripe A H1N1 la razón principal de este comportamiento.

No ha podido establecerse la asociación entre población infantil y gripe A H1N1 2009 debido al insuficiente número de muestras de niños procesadas. El traslado del servicio de pediatría de nuestro Hospital en el mes de Octubre del año 2009 hizo que el número de muestras pediátricas recibidas fuese muy reducido.

El sexo no parece ser un factor determinante a la hora de padecer una infección por el virus de la gripe A H1N1 2009. No hemos encontrado diferencias significativas entre hombres y mujeres. Aún así, el sexo podría verse modificado por otros factores como la edad. Existen datos en la bibliografía que muestran diferencias en la incidencia de infección entre hombres y mujeres según la edad, siendo este parámetro mayor en mujeres jóvenes que en

hombres de la misma edad (138;139). Por tanto, parece probable que las diferencias en el sexo pueden ser edad dependientes, y que para poder establecer diferencias entre hombres y mujeres haya que considerar este factor.

El tipo de muestra utilizada para la determinación de la gripe A por RT-PCR, no tuvo ninguna influencia en los datos obtenidos. Las muestras nasofaríngeas y los aspirados nasales son las recomendadas para la determinación de gripe A H1N1 2009, aunque también pueden emplearse otros tipos de muestras respiratorias (86;100;101). No obstante, parece ser que en muestras faríngeas la capacidad de detección es menor que en muestras nasales y nasofaríngeas (140). De todas formas han de tenerse en cuenta otros factores como pueden ser la carga viral, la patología presente en el individuo, y el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la toma de la muestra a la hora de valorar los resultados.

Síntomas generales como la fiebre, el malestar general, el dolor de garganta, la tos y la rinorrea aparecen con frecuencia en individuos infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009. Sin embargo, muchos de estos síntomas son comunes a otras infecciones respiratorias y, por tanto, no siempre pueden asociarse la presencia de la variante pandémica de la gripe. El análisis multivariante de nuestros resultados reveló que sólo el malestar general y el dolor de garganta podían asociarse de manera significativa con la enfermedad gripal.

El tener fiebre no se asoció a padecer una gripe A H1N1 2009 en nuestra población de estudio. Aunque este es el síntoma que más aparece en los pacientes infectados, también existen en torno a un 8-32% de casos leves sin fiebre (64). Por lo tanto, en los pacientes de nuestro estudio que acudían al médico por fiebre, lo más probable era que no tuvieran éste síntoma por una gripe A H1N1 2009.

El malestar general y el dolor de garganta también son síntomas que aparecen en los pacientes infectados de forma habitual, aunque en mucha menos proporción que la fiebre y la tos (38;52;56;57;64-66;97;107;124;125). En este trabajo hemos observado que padecer malestar general y dolor de

garganta, en el momento del diagnóstico, se asociaba a sufrir una infección por virus de la influenza A H1N1 2009, una vez aplicado el modelo multivariante.

La tos también puede asociarse ( $p=0,013$ ), junto con la rinorrea ( $p=0,060$ ), a una mayor probabilidad de padecer la infección, aunque finalmente fueron eliminadas por el modelo multivariante. El resto de síntomas no tuvieron importancia estadísticamente significativa, aunque todos ellos salvo la disnea, los vómitos y la cefalea, mostraron una mayor probabilidad para los individuos que las sufrían de padecer la infección.

Las enfermedades crónicas de pulmón constituyen la principal comorbilidad en pacientes afectados por la gripe A H1N1 2009 (9;104;106;107;111;123). En nuestro análisis se observó una mayor predisposición a adquirir la enfermedad en los pacientes que presentaban estas patologías, especialmente el asma. Al aplicar el modelo multivariante, observamos que los pacientes asmáticos poseían una mayor predisposición a adquirir la infección que los que no padecían esta complicación ( $p<0,001$ ), siendo estos resultados coincidentes con los que aparecen en otros estudios (106).

El resto de las comorbilidades presentes en la población a estudio no supusieron un mayor riesgo de enfermedad grave, es más, patologías de base como la hipertensión arterial y la diabetes mostraron el efecto contrario, si bien es cierto que, al igual que sucedió con las enfermedades cardíacas, la asociación encontrada no tuvo significación estadística.

El hecho de que los pacientes que padecían estas comorbilidades se mostraran con menor propensión a padecer la infección, choca con la idea establecida de que son factores predisponentes para desarrollar una infección grave (75). En un estudio realizado en Noruega, la HTA se asoció a un mayor riesgo de hospitalización en UCI en pacientes infectados con el virus de la gripe A H1N1 2009 (104). Esta contradicción podría explicarse por el hecho de que en nuestro estudio los pacientes con patologías previas se encontraran sometidos a un control más riguroso de sus procesos infecciosos y, por lo tanto, se detectara antes la infección por el virus y se pudiera evitar el desarrollo de una enfermedad más grave.

La insuficiencia renal crónica y alguna comorbilidad de las llamadas mayores, también se asoció a una menor probabilidad de infección, aunque en esta ocasión tampoco se alcanzó la significación estadística.

A pesar de que es un hecho constatado que la neumonía es la principal complicación que se desarrolla en la gripe A H1N1 2009 (43;52;54;97;129), dentro de nuestra población de estudio la neumonía no se relacionó con padecer la infección por el virus de la gripe A H1N1 2009 ( $p < 0,001$ ), más bien sucedió todo lo contrario. Es decir, las personas que acudieron a los distintos hospitales de los que el HCSC era el centro de referencia y que fueron diagnosticados de neumonía, tenían mayor probabilidad de que esta neumonía estuviera provocada por un microorganismo diferente a la gripe A H1N1 2009. Todo esto permite concluir que hubo muchos pacientes con sospecha de infección por gripe A H1N1 2009 que finalmente padecían infecciones por otro microorganismo.

Algo similar ocurrió con los pacientes que desarrollaron shock y/o sepsis. La infección por el virus pandémico no fue en ningún caso un factor predisponente para ninguno de los dos sucesos. Los datos estadísticos obtenidos en ambos casos ( $p = 0,021$  y  $0,038$  respectivamente) muestran que el paciente que tenía un shock o una sepsis no lo desarrollaba debido al virus, aunque el bajo número de complicaciones que se observaron en nuestra población no permite extraer conclusiones categóricas.

El número de ingresos hospitalarios (tanto en UCI como en cualquier otro servicio del Hospital) que se produjeron durante el periodo que abarca este estudio no se vio alterado por la circulación del virus de la gripe. La mayor parte de los ingresos fueron debidos a patologías no provocadas por la gripe A H1N1 2009. Lera *et al.* también observaron este comportamiento dentro de un estudio de población pediátrica (106). Este hecho pone de manifiesto que fueron mayoritarias las gripes leves que no necesitaron ingreso, frente aquellas que si lo requirieron, tal y como se observa en la mayoría de publicaciones (34;54;130).

Los individuos que poseían un resultado microbiológico positivo para algún microorganismo mostraron menor probabilidad de estar infectados por el virus de la gripe A H1N1 2009 ( $p=0,002$ ).

El conjunto de los resultados obtenidos nos permite afirmar que, en nuestra población de estudio, el padecer una gripe A H1N1 2009, se asoció a la presencia de malestar general y dolor de garganta en el momento del diagnóstico, a padecer antecedentes de asma y a ser una persona con edad inferior a los 65 años.

## **2.2 Mujeres en edad fértil**

Durante la pandemia del virus de la gripe A H1N1 2009 se observó un incremento en la morbi-mortalidad de la enfermedad en mujeres gestantes (51;52;54;55;80;139;141-144). Para poder determinar si el embarazo se comportaba como un factor predisponente a padecer gripe A H1N1 2009 se seleccionaron, de entre todas las muestras recibidas, aquellas correspondientes a mujeres en edad fértil (15-50 años). En el análisis univariado se observó una mayor probabilidad de sufrir la infección en mujeres embarazadas ( $p=0,02$ ), dato que se corroboró en el análisis multivariante ( $p=0,01$ ).

Aunque numerosos estudios establecen una clara asociación entre el embarazo y el riesgo de padecer una infección grave por el virus de la gripe A H1N1 2009 (54;55;75;79;97), en nuestro trabajo el 52,6% de las mujeres en edad fértil con prueba positiva para la gripe pandémica no eran gestantes, por lo que parece clara la existencia de otros factores de riesgo en esta población (120). En este sentido, las pacientes con asma ( $p=0,041$ ) y malestar general ( $p=0,070$ ) mostraron una mayor probabilidad de infección.

En un estudio norteamericano en mujeres embarazadas infectadas por el virus de la gripe A H1N1 2009 (145), se encontró que la principal comorbilidad que presentaban estas mujeres era el asma(22,9%), porcentaje que aumentaba considerablemente en las fallecidas(43,5%). Nuestros datos muestran que, tanto el asma como el embarazo, se comportaron como factores



de riesgo dentro de la población de mujeres en edad fértil, por lo que mujeres que sumaran ambos factores podrían tener un mayor riesgo de infección.

La presencia de otros factores de riesgo puede incrementar el riesgo de enfermedad grave en mujeres embarazadas. La presencia de comorbilidades conocidas en mujeres embarazadas con enfermedad grave esta documentada en varios estudios, variando en porcentajes del 16-56% (55;79;145-149).

### **3. Estudio de la carga viral y factores que influyen en ella**

El estudio de la carga viral, gracias a la implantación de la RT-PCR a tiempo real como método de referencia para el diagnóstico de la gripe A H1N1 2009, puede abrir muchas vías de investigación a la hora de entender mejor la patogenia de la enfermedad y el comportamiento del virus dentro del organismo. El principal problema que surge al hablar de carga viral, no solo con el virus de la gripe A H1N1 2009, sino con otros virus influenza, es que no existe un protocolo estandarizado para la medida de la misma, es decir, cada investigador sigue unos parámetros propios y obtiene unos resultados que luego son difíciles de comparar con los obtenidos por otros investigadores que utilicen métodos diferentes. Así por ejemplo, en estudios previos con otros virus de gripe A, algunos autores afirman que los virus de la gripe A H3N2 alcanzan valores más elevados de carga viral en muestras faríngeas que los virus H5N1 (150;151), mientras que en otras publicaciones se afirma justamente lo contrario (152).

En este estudio, la mediana de carga viral se situó en  $1,93 \times 10^4$  cop/ml (P25=  $7,6 \times 10^2$  cop/ml; P75=  $5 \times 10^5$  cop/ml), y la media en  $1,5 \times 10^6$  cop/ml (desviación típica= 6720639). Estos resultados son similares a los encontrados en la bibliografía, donde aparecen valores medios de carga viral entre  $10^5$ - $10^6$  cop/ml (77;153;154) y valores de mediana de  $3,98 \times 10^4$  cop/ml (155). La excepción la constituye el trabajo de To *et al.* en el que los autores sitúan la media en  $1,84 \times 10^8$  cop/ml (156). Todos estos trabajos están realizados con muestras utilizadas para el diagnóstico y provenientes de pacientes no tratados en el momento de la toma. En un estudio realizado en Taiwán, el 62% de las cargas virales tras una primera toma faríngea se situaban entre  $10^3$  y  $10^5$  cop/ml (78). Estos valores medios de cargas virales son inferiores a los

encontrados en estudios realizados con otros virus de la gripe A (H3N2 y H5N1), en los que se observan valores superiores de carga viral (77;152;154;157).

No parece que el sexo pueda afectar a los valores de carga viral. Nosotros no encontramos diferencias entre hombres y mujeres, al igual que en el trabajo de Yang *et al.* (154).

El estudio de la carga viral en función de la edad de los pacientes mostró que los niños menores de 4 años y los adultos por encima de los 65 años poseían cargas virales un logaritmo por debajo de los del resto de poblaciones. Sin embargo, las diferencias observadas no fueron suficientes para establecer una asociación clara entre edad y valor de carga viral como ya habían descrito otros autores (76;154).

Tampoco el tipo de muestra empleado para la realización de la prueba fue determinante para el resultado de la carga viral. Si bien los aspirados nasofaríngeos se consideran el “gold standard” para la toma de muestras en infecciones de gripe A, se ha observado que la cantidad de virus detectado no es significativamente diferente entre estos aspirados y los hisopos nasofaríngeos (158). También debido a su alta sensibilidad, los hisopos nasales y faríngeos son considerados alternativa eficaz a los dos anteriores (140;158). Li *et al.* observaron que no existían diferencias entre los valores de la carga viral del virus de la gripe A H1N1 2009 y los diferentes tipos de muestras extraídas a la vez en el mismo individuo (76).

Analizando la carga viral por sintomatología, observamos que los pacientes que referían fiebre en el momento de la toma, poseían un logaritmo de carga viral menor que los que no padecían estos síntomas ( $10^4$  frente  $10^5$  cop/ml,  $p=0,443$ ). Sólo encontramos un estudio en el que se comparaba cargas virales de pacientes hipertérmicos frente pacientes afebriles. Los resultados de este trabajo discrepan de los obtenidos en nuestro estudio ya que Li *et al.* obtienen una media de carga viral mayor en los pacientes con fiebre ( $p=0,004$ ) (78).

Los pacientes que referían malestar general poseían significativamente valores de carga viral más bajos ( $1,9 \times 10^3$  cop/ml frente  $9,7 \times 10^4$  cop/ml) que los que no mostraban esta sintomatología ( $p=0,05$ ), situándose en el mismo logaritmo que los pacientes febriles (en torno a  $10^3$  cop/ml). Además el tener malestar general se asoció con una mayor probabilidad de tener cargas virales por debajo de 2000 cop/ml ( $p=0,009$ ), al igual que sucedía en los pacientes con fiebre.

Por regla general, los pacientes que padecían sintomatologías sistémicas como fiebre, malestar general, disnea y artralgias poseían unos valores de carga viral en torno a  $10^3$ - $10^4$  cop/ml. Por el contrario, pacientes con sintomatologías más locales, como dolor de garganta, tos y rinorrea se situaban en cargas virales algo mayores ( $10^4$ - $10^5$  cop/ml).

Los pacientes que presentaban una comorbilidad mayor, no solo tenían una carga viral mucho más baja que los que no las padecían ( $p=0,012$ ), sino que además tenían una mayor probabilidad de tener cargas virales por debajo de 2000 cop/ml ( $p=0,012$ ). Lo mismo ocurrió con los individuos que padecían cáncer, en especial cáncer sólido metastásico. Estos datos contrastan con otros publicados para virus de la gripe A H3N2, donde asocian cargas virales altas con padecer comorbilidades mayores (157).

Los pacientes asmáticos, diabéticos tipo I/II, embarazadas y con IRC, poseían cargas virales superiores a las de los pacientes sin esos síntomas. En otras publicaciones también han observado una tendencia a cargas virales altas en mujeres embarazadas (159).

Los pacientes con enfermedades crónicas del pulmón y trasplantados renales tenían mayor probabilidad de poseer cargas virales por encima de 2000 cop/ml y 110000 cop/ml respectivamente ( $p=0,033$  y  $0,020$  respectivamente), por lo que estas dos patologías se asociaron a cargas virales más elevadas.

No hemos encontrado bibliografía en la que se correlacionen los valores de carga viral del virus de la gripe A H1N1 2009 con los antecedentes personales de los pacientes, por lo que no hemos podido establecer si

nuestros resultados son coincidentes con lo que sucede en otras zonas o con otras poblaciones.

El análisis de las cargas virales de los pacientes con neumonía, mostró una mayor probabilidad, dentro del grupo de pacientes con esta patología, a tener valores por debajo de 2000 cop/ml. Además, su valor de mediana de carga viral también era inferior a la de los pacientes sin esta patología ( $p=0,008$ ). Existen pocos trabajos en los que se correlacione la carga viral con la gravedad de las enfermedades del tracto respiratorio. Un trabajo del año 2010 establece la carga viral de pacientes con neumonía en  $8,31 \times 10^4$  cop/ml, un logaritmo por encima del valor obtenido en nuestro estudio ( $1,4 \times 10^3$  cop/ml). Este valor era superior al de otros enfermos que padecían enfermedades del tracto respiratorio superior y bronquitis (78). Por el contrario, Duchamp *et al.* encontraron cargas virales más altas en pacientes con infecciones del tracto respiratorio superior, y en ningún caso correlacionaron estas carga virales altas con casos graves de enfermedad (153).

Se obtuvo una gran diferencia (3 logaritmos menos de carga viral) entre los pacientes coinfectados por otro microorganismo y los que no lo estaban, pero el reducido número de casos con estas características hizo que el resultado no se mostrara estadísticamente significativo.

Como ya se ha mencionado, el criterio de hospitalización varió a lo largo del periodo de estudio, por lo que los resultados de valores de carga viral en ingresados deben tomarse con precaución. Aún así, puede observarse que en nuestra población, los pacientes ingresados presentaban una mayor probabilidad de poseer cargas virales por debajo de 2000 cop/ml ( $p=0,022$ ). No se han encontrado datos de otros autores de cargas virales de gripe A pandémica en pacientes ingresados por lo que no es posible establecer comparaciones. Tan solo hemos encontrado un trabajo realizado con virus influenza H3N2 en el que, al contrario de lo que sucede con nuestros datos, la carga viral fue mayor en los individuos hospitalizados que en los pacientes dados de alta (157).

Como compendio de todos los resultados del modelo multivariante, podemos afirmar que para nuestra población, los factores que modifican el

valor de las cargas virales han sido el malestar general, la inmunosupresión (trasplantado renal) y el padecer una/s comorbilidad/es mayor/es. Finalmente fueron eliminados del modelo tanto la fiebre, como las enfermedades crónicas del pulmón y la edad.

El hecho de que los pacientes trasplantados renales tengan una mayor tendencia a poseer cargas virales más altas (OR:4,85; IC 95%:0,989-23,784) puede deberse a la inmunosupresión a la que se encuentran sometidos por el tratamiento antirechazo. El uso de altas dosis de corticoesteroides puede provocar una mayor replicación viral y un tiempo de eliminación del virus más prolongado (157;160). Este fenómeno también se ha observado con otros virus como en el virus respiratorio sincitial y en los coronavirus (161;162). Otros autores también observan un mayor tiempo de excreción viral en pacientes inmunocomprometidos y niños (77;159). Sin embargo, en otras publicaciones se afirma que esta excreción viral prolongada también se puede encontrar en adultos inmunocompetentes con enfermedad leve (163).

El hecho de que las comorbilidades mayores se asocien a cargas virales bajas, inferiores a 2000 cop/ml, no deja de ser una contradicción. Los pacientes con estas patologías se encuentran en riesgo de sufrir enfermedad grave por gripe A H1N1 2009, por lo que resultaría lógico pensar en un principio que debieran tener cargas virales elevadas. Esto ocurre en otros virus de la influenza, donde es necesaria una eficiente replicación viral para la patogénesis de la enfermedad y para provocar mayores complicaciones (152;157). Si a esto le sumamos que los pacientes con fiebre, malestar general, neumonía e ingresados también tenían una mayor tendencia a poseer cargas virales inferiores a 2000 cop/ml, podríamos llegar a la conclusión de que no es necesario que la carga viral del virus sea alta para provocar una enfermedad grave.

La inmunopatogenia del virus de la gripe A H1N1 2009 no se conoce aún con exactitud. Se sabe que durante los procesos de enfermedad grave el virus induce la secreción de citoquinas proinflamatorias procedentes de linfocitos Th1 y Th17 en una mayor proporción que en pacientes con enfermedad leve (164). Una producción incontrolada de estas citoquinas puede producir daño

tisular en tejidos infectados (165). Esta respuesta proinflamatoria puede ser la causa de los síntomas respiratorios graves de la enfermedad, que además puede ser el reflejo de una respuesta energética del huésped necesaria para el aclaramiento del virus (166). Por otro lado, se conoce la mayor susceptibilidad a adquirir infecciones bacterianas secundarias en los pacientes con infecciones de virus de la influenza (167). En las infecciones pulmonares producidas por estos virus, éstos pueden ser capaces de estimular la producción de glucocorticoides por una vía en parte independiente a la de las citoquinas proinflamatorias, lo que ocasionaría una supresión de la respuesta sistémica inmune frente a infecciones bacterianas secundarias. Esta producción de glucocorticoides es necesaria para controlar la respuesta inflamatoria durante la coinfección para prevenir una inmunopatología letal (168). Otros autores apuntan a que el virus de la gripe A H1N1 2009 puede crear una insuficiencia selectiva en la respuesta inmune innata frente a *S. pneumoniae*, probablemente mediada a través de los linocitos Th1(169).

El papel de la carga viral en el desarrollo de la enfermedad grave aún es desconocido. Existen datos contradictorios en este sentido. Por un lado se apunta a que los enfermos que sufren neumonías o patologías graves poseen cargas virales superiores a las de los pacientes con patologías leves del tracto respiratorio superior (170). Por otro lado, hay publicaciones que aseveran que la carga viral es un factor importante pero no el único (171), e incluso hay trabajos que directamente cuestionan el papel de la carga viral en relación a la severidad de la enfermedad. Este último es un estudio realizado en la India donde observan valores bajos de carga viral en aspirados pulmonares de pacientes críticos y donde desestiman la carga viral como factor de fatalidad (172).

En nuestro estudio, las cargas virales bajas (menores a 2000 cop/ml) se asociaron a los pacientes con neumonía, pacientes con sintomatología sistémica (fiebre y malestar general), y pacientes con factores de riesgo para desarrollar enfermedad grave (comorbilidades mayores). No existe en la literatura un valor de referencia para determinar si los valores de carga viral son altos ó bajos. Nosotros llamamos bajos a los menores de 2000 cop/ml en base a los valores de mediana obtenidos de la muestra total. Mientras no aparezcan

más estudios de estas características, no podrá determinarse de manera inequívoca qué valores de carga viral son necesarios para desarrollar estas complicaciones. Lo que nuestros datos aportan es la posibilidad de que estos valores pudieran ser relativamente bajos, y que otros factores anteriormente mencionados como una respuesta inmune exagerada o el padecer otras coinfecciones, pudieran ser determinantes a la hora de desarrollar una infección grave. Debe también tenerse en cuenta que el pico máximo de carga viral se alcanza en los primeros días tras la aparición de los síntomas (156), y que este valor va decreciendo conforme pasan los días (159). En el caso de las infecciones más complicadas, el tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta el diagnóstico de neumonía puede llevar unos días, con la consiguiente disminución de la carga del virus en el momento de la toma de la muestra. En nuestro estudio nos encontramos la limitación de que todas las muestras fueron tomadas del tracto respiratorio superior. Lo ideal hubiera sido tomar muestras lo más cercanas posibles al pulmón en aquellos pacientes con neumonía, ya que los aspirados endotraqueales y los obtenidos por broncoscopias poseen mayor rendimiento en pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior (173;174), pero no fue posible contar con este tipo de muestras.

#### **4. Estudio de factores predisponentes para padecer neumonía en pacientes con gripe A H1N1 2009**

Para medir el impacto y la gravedad de los casos producidos por el virus de la gripe A H1N1 2009, se han realizado estudios en pacientes hospitalizados, pacientes que requieren ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos y fallecidos a causa del virus. En nuestro caso, debido a que el número de pacientes ingresados en UCI fue muy reducido, no pudimos estudiar este grupo para establecer criterios de gravedad. Tampoco fue posible realizar un estudio en pacientes fallecidos debido a que solo se produjeron dos exitus a causa del virus. Por otro lado y, debido a la disparidad de criterios en la hospitalización de los pacientes sospechosos en la mayoría de los hospitales que enviaron muestras a nuestro laboratorio, tampoco pudo utilizarse la hospitalización como criterio de gravedad. Por este motivo, se seleccionaron todos aquellos pacientes infectados con el virus de la gripe A H1N1 2009 con

diagnóstico de neumonía para determinar factores de riesgo de gravedad en la población afectada, ya que, como es sabido, la neumonía constituye la principal complicación de la infección por el virus de la gripe A pandémica, y es la principal causa de admisión en UCI en estos enfermos (41). Algunos autores asocian la neumonía con el desarrollo de enfermedad grave (175) y se cifra que en torno al 18-66% de los pacientes hospitalizados con gripe A H1N1 2009 poseen evidencia radiológica de esta patología (51;52;66;176). En estudios realizados post-mortem, se encontraron indicios de neumonía en la mayoría de los pacientes fallecidos, aunque ello no implicaba que fuese ésta la causa de la muerte (177;178).

En nuestro estudio no pudo determinarse que la edad o el sexo tuvieran repercusión a la hora de desarrollar una neumonía. Sin embargo, otros autores encuentran resultados distintos. Debido a las particularidades de esta pandemia, donde los afectados han sido principalmente los niños y jóvenes adultos, la bibliografía refiere que ha sido en estos grupos en los que más neumonías se han desarrollado (112;175). Algo similar sucede con el sexo. Diversas publicaciones apuntan a que las mujeres son objeto de mayor hospitalización con enfermedad grave, mayores complicaciones y peor desarrollo de la enfermedad que los hombres (51-55;139;142;143;179-187). Pudiera pensarse que, dado que el embarazo es considerado uno de los principales riesgos de complicación, fuese este hecho el que determinara una mayor gravedad de la enfermedad en el sexo femenino. Sin embargo, la mayoría de las mujeres en edad fértil no están embarazadas, por lo que deben existir otros factores que contribuyan a la mayor severidad. Una de las explicaciones pudiera ser que algunas de las comorbilidades importantes para desarrollar gripe A H1N1 2009 que aparecen reflejadas en la bibliografía, como las enfermedades crónicas del pulmón, en especial el asma y las exacerbaciones de EPOC, afectan y tienen un curso más grave en mujeres que en hombres (188-191).

En cualquier caso, para poder establecer una relación clara entre edad, sexo y neumonía se deberían aglutinar y dividir la población en grupos de edad por sexo, de forma que pudiera analizarse el comportamiento de cada subgrupo de manera independiente.



Aunque están bien establecidos los factores de riesgo para desarrollar una complicación o una infección grave por el virus de la gripe A H1N1 2009 (9;36;51;52;55;65;75;79;97;110;145;192;193), existen datos que sugieren que existe entre un 25% y un 50% de la población hospitalizada o fallecida que no posee ningún factor de riesgo asociado (49;51;54;55;65). En nuestro estudio, tras aplicar el análisis multivariante, obtuvimos que las comorbilidades mayores, las enfermedades neurológicas y la diabetes se asociaban a un mayor riesgo de padecer neumonía ( $p=0,02$ ;  $p=0,012$ ;  $p=0,038$  respectivamente). Todas estas comorbilidades se encuentran recogidas como factores predisponentes a padecer complicaciones por el virus en diferentes publicaciones (9;36;75).

Por el contrario y, en discordancia con los datos publicados, encontramos que, en conjunto, tanto las enfermedades crónicas del pulmón como las inmunosupresiones suponían un menor riesgo para el desarrollo de la enfermedad grave. Analizando cada uno de estos grupos independientemente, los pacientes con VIH y aquellos que estaban en tratamiento con quimioterapia, sí se mostraban como factores de riesgo para la neumonía, al igual que los pacientes EPOC. El asma, considerado uno de los factores de riesgo más importantes, en nuestro estudio no se comporta como tal al aplicarse a la población general. En este sentido, Nguyen-Van-Tam *et al.* atribuyen un mayor riesgo de hospitalización en UCI y muerte a pacientes con enfermedad crónica de pulmón que no sea ni asma ni enfermedad pulmonar crónica obstructiva (175). En cualquier caso, ninguno de los resultados de nuestro estudio relatados en este último párrafo alcanzó significación estadística.

No se pudo relacionar el hecho de estar embarazada con la posibilidad de padecer una neumonía por el virus de la gripe A H1N1 2009. Ya se conocía que en pandemias anteriores de gripe, como la de 1918 y la de 1957, la mortalidad en mujeres embarazadas era superior a la del resto de la población. Así, en un estudio realizado sobre 1350 casos de mujeres embarazadas durante la pandemia de 1918, el 50% desarrolló neumonía y de éstas más de la mitad murieron (194). Durante la pandemia de 1957, el 50% de las muertes debidas a la gripe asiática en Minnesota, entre mujeres en edad fértil, se produjeron en mujeres embarazadas (195). Además, existen artículos que

demuestran un mayor riesgo de complicaciones respiratorias y cardiopulmonares durante temporadas epidémicas gripales en mujeres embarazadas (196;197). Durante la pandemia de 2009 el embarazo se ha considerado por si mismo como factor de riesgo para enfermedad severa. Según nuestros datos, no ha podido demostrarse esta asociación, seguramente debido al reducido número de mujeres embarazadas en la población incluida en el estudio y a los pocos casos de ingresos en Unidades de Cuidados Intensivos.

Los pacientes obesos, y especialmente los obesos mórbidos (índice de masa corporal  $\geq 35$ ) tienen entre 5 a 10 veces más altas las tasas de enfermedad grave y muerte que las de la población general (51;54;55;81). En nuestro estudio fue imposible establecer ninguna relación debido al bajo número de pacientes obesos.

Otras comorbilidades analizadas, como por ejemplo el tabaquismo, las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia renal crónica y la HTA, también se mostraron como factores de riesgo para neumonía, aunque en ningún caso fueron estadísticamente significativos.

Estudios de la pandemia de gripe del año 1919, sugieren que la mayoría de muertes relacionadas con el virus fueron causadas por neumonías bacterianas secundarias (133). Algunos resultados de la pandemia del 2009 muestran que, alrededor del 30% de las neumonías relacionadas con el virus de la gripe A H1N1 2009, tienen evidencia de coinfección bacteriana (41;129;184) y, que en alrededor del 20-24% de los pacientes ingresados en UCI existe evidencia o sospecha de infección bacteriana (54;55;67;68). En nuestro estudio, tras aplicar el modelo multivariante, pudieron relacionarse las coinfecciones con una mayor probabilidad de padecer neumonía en pacientes infectados con el virus ( $p=0,02$ ) y, por lo tanto, con la aparición de enfermedades más graves.

El microorganismo más común en estas coinfecciones fue el *S. pneumoniae*, mayoritario también en la mayoría de publicaciones relacionadas con este tema (104;123;124;128;129). *Palacios et al.* relacionaron la presencia

de *S. pneumoniae* con desarrollo de enfermedad severa en el grupo de edad de 6 a 55 años (135).

Como ya se ha comentado en el punto 3 de la discusión, el papel de la carga viral se encuentra actualmente bajo discusión. Al igual que en el punto anterior, al comparar los pacientes sin/con neumonía, observamos que estos últimos tenían mayor probabilidad de tener cargas virales inferiores a 2000 cop/ml ( $p=0,01$ ). Sin embargo, al aplicar el análisis multivariante, el modelo elimina esta variable, por lo que no podemos corroborar esta asociación inicial. Sí podemos decir que existe una tendencia, dentro de nuestros pacientes con neumonía, a valores de carga viral baja. Es probable que si el número de muestras con estas características hubiese sido mayor se hubieran obtenido datos más concluyentes. Tal y como se comentó en el apartado 3 de la discusión, parece que el virus de la gripe A H1N1 2009 no necesita cargas virales altas para producir patología severa, al contrario de lo que ocurre con otros virus de la influenza (152;154;156;157) y en otras patologías producidas por diferentes virus (virus de la hepatitis A, B y C, virus respiratorio sincitial, virus herpes, virus de la inmunodeficiencia humana) donde una mayor carga viral se asocia a una peor evolución de la enfermedad (198-201). Se necesitarían realizar más estudios encaminados a corroborar estos datos, principalmente utilizando muestras del tracto respiratorio inferior en pacientes con complicaciones. En nuestro estudio tuvimos pocas muestras de este tipo ya que apenas hubo casos graves que necesitaran ingreso en UCI.

Por tanto, en nuestra población de estudio, el riesgo de sufrir una neumonía, estando infectado por el virus de la gripe A H1N1 2009, se asoció a padecer previamente una comorbilidad mayor, y/o diabetes, y/o enfermedades neurológicas y a sufrir una coinfección bacteriana. La carga viral del virus no resultó un factor determinante, aunque existen indicios para pensar que estos virus no necesitan cargas virales altas para desarrollar patologías graves. Según nuestros datos, el riesgo de infección grave se asociaría principalmente a padecer alguna patología previa (de las mencionadas anteriormente), es decir, a factores propios del huésped. También la existencia de una coinfección concomitante a la del propio virus elevó las probabilidades de sufrir una

neumonía. El papel de la carga viral quedaría en entredicho a la vista de éstos resultados.

## **5. Utilidad de diversas técnicas diagnósticas para determinación gripe A H1N1 2009**

Durante la fase pandémica, el número de afectados por la gripe A H1N1 2009 que acudía a los hospitales y centros de salud era tan elevado, que en muchas ocasiones no era posible atender con la rapidez adecuada la elevada demanda de solicitud de pruebas de confirmación por PCR a tiempo real. Para paliar esta situación, se desarrollaron pruebas de detección alternativas a la considerada como técnica de referencia, en un intento de dar una respuesta más rápida y eficaz a esta situación. La mayor parte de estas técnicas junto con la rapidez llevaban, en muchos casos, la ventaja asociada de una mayor simplicidad en su realización y una necesidad menor de infraestructura. Sin embargo, antes de poder usarse de manera rutinaria, es imprescindible conocer sus limitaciones de sensibilidad y especificidad. Por este motivo, durante el desarrollo de este estudio se evaluaron una serie de kits diagnósticos para gripe A H1N1 2009 de diferentes características y se compararon con la técnica de referencia.

De todas las técnicas evaluadas, fueron las técnicas moleculares las que ofrecieron los mejores resultados.

El análisis del test *CLART® Fluavir* mostró unos valores de sensibilidad coincidentes con los marcados por el fabricante, no así en cuanto a la especificidad. Este test tiene establecidos unos valores de especificidad y de sensibilidad del 100% para gripe A H1N1 2009 siempre que los valores de carga sean superiores a 200 cop/ml (10 cop/PCR). Todas las muestras analizadas con cargas virales por encima de este valor fueron positivas en nuestros ensayos. Las 5 muestras que resultaron negativas por microarrays poseían cargas virales por debajo de este valor. Cabe destacar que 7 muestras con cargas virales inferiores al límite de detección mencionado resultaron positivas, lo que indica que por debajo del límite establecido es posible detectar alguna muestra positiva pero que para estos valores de carga la sensibilidad disminuye. En cuanto a la especificidad, hemos de comentar que 12 muestras

negativas por la técnica de referencia fueron positivas por los microarrays; todas estas muestras tenían valores cercanos al límite de detección de ambas técnicas por lo que las discrepancias pueden ser debidas a falta de sensibilidad en alguno de los ensayos o a la posibilidad de que los arrays produzcan falsos positivos.

Los resultados del test *Speed Oligo*® obtenidos en nuestros ensayos mostraron una menor discrepancia con lo estipulado por el fabricante. Según datos del fabricante, el test posee una especificidad del 100% y una sensibilidad del 97,5% con un límite de detección de 50 cop/ml (1 cop/PCR). En nuestro ensayo, si bien todas las muestras positivas tenían valores de carga viral superiores a 50 cop/ml, hubo dos muestras con cargas por encima de este valor (79,8 y 390 cop/ml respectivamente), que fueron negativas. Algunos autores sitúan la sensibilidad de esta técnica en el 100% y son capaces de detectar valores de carga viral inferiores a 1 cop/reacción (<50 cop/ml) (202). En cuanto a la especificidad solo reseñar que las 2 muestras negativas por el método de referencia también lo fueron por este test. Dado que sólo se ha realizado el test sólo a 10 muestras es aventurado emitir afirmaciones concluyentes. De manera general, y apoyándonos también en los datos publicados al respecto, parece que éste pudiera ser un buen método en ausencia de la técnica de referencia, si bien es cierto que la visualización mediante dipstick tiene algunas limitaciones, ya que la subjetividad visual de la persona encargada de la lectura puede hacer que se produzcan falsos positivos y falsos negativos, sobre todo en aquellas muestras con cargas virales cercanas al límite de detección. Esta pudiera ser una de las causas por la que se obtuvo un resultado negativo con las dos muestras positivas por la técnica de RT-PCR a tiempo real y con cargas superiores al límite de detección establecido por el fabricante.

En el estudio comparativo se incluyeron dos test rápidos inmunocromatográficos, ya que este tipo de ensayos son fáciles y rápidos y su realización está al alcance de cualquier centro al no requerir ninguna infraestructura ni entrenamiento previo de la persona que lo realice. Estos test no son específicos para la determinación de gripe A H1N1 2009, por lo que los valores de sensibilidad y especificidad que dan las respectivas casas

comerciales están referidos a la determinación de gripe A y/o gripe B en general y no específicamente a la variante pandémica. El test *Clearview® Exact Influenza A & B* muestra, según anotaciones del fabricante, una especificidad del 98,5% y una sensibilidad del 88,6% para la determinación de gripe A. En nuestro estudio sólo obtuvimos 3 resultados positivos por esta técnica, los tres pertenecientes a muestras con valores de carga viral altos (por encima de  $10^5$  cop/ml). Las muestras que resultaron negativas poseían valores de carga viral de  $10^5$  cop/ml ó inferiores. Por tanto, ésta técnica parece válida siempre y cuando los valores de carga viral presentes en los pacientes sean elevadas. Los datos de Ortiz de la Tabla *et al.* coinciden con los nuestros, e indican una sensibilidad para este test del 19% (203). Sin embargo, en un estudio realizado en pacientes pediátricos, este valor asciende al 59% (204), debido principalmente a que los valores de cargas virales en niños son superiores a las de los adultos. En cuanto a la especificidad decir que todas las muestras que fueron negativas por el método de referencia, lo fueron también por este test inmunocromatográfico

El test *Quick Vue® Influenza A+B* mostró resultados mejores que los del anterior. Todas las muestras que resultaron positivas por esta técnica, poseían cargas virales por encima de  $2,4 \times 10^2$  cop/ml. Sin embargo, hubo muestras con cargas virales de  $10^2$ - $10^3$  cop/ml que resultaron negativas. En cualquier caso, esta técnica demuestra tener una mayor capacidad de detección que el test *Clearview® Exact Influenza A & B*, al detectar muestras con cargas virales más bajas. Todas las muestras negativas por la técnica de referencia, lo fueron también por esta técnica. En la literatura encontramos datos de sensibilidad para este test que varían entre el 25-77% (144;174;205-207). Estas variaciones dependen del tipo de población en estudio, los rangos de edad y del tipo de prueba frente a la que se comparen (208). La sensibilidad más baja aparece en un estudio de pacientes ingresados en UCI y en el que se compara esta técnica inmunocromatográfica frente a la RT-PCR (174). Los valores de especificidad de estos estudios fueron muy parecidos a los nuestros.

Como ya se ha mencionado, el uso de estos test rápidos inmunocromatográficos, para la determinación de gripe A H1N1 2009, surgió a raíz de la necesidad de una respuesta rápida frente a la alta demanda de

diagnóstico de la enfermedad. Estos test tienen la ventaja de ser más rápidos, más económicos y no necesitan personal cualificado ni condiciones especiales para su realización. En su contra encontramos que poseen unos bajos valores de sensibilidad, los cuales, dependiendo del test empleado y de la técnica de referencia utilizada, pueden variar entre el 19-77% (208). En este sentido, el test *Quick Vue® Influenza A+B* ha sido el que mejores resultados de sensibilidad ha mostrado al compararse con otros kits comercializados (208), sin embargo estos resultados siguen sin ser óptimos, por lo que su utilización conlleva un riesgo considerable de emitir un resultado falso negativo. Estas bajas sensibilidades vienen determinadas por los valores de carga viral de gripe A H1N1 2009 que son capaces de detectar. Como ya hemos ido comentando a lo largo de toda la discusión de la tesis, existe la sospecha de que los virus de la gripe A H1N1 2009 aparecen en las muestras biológicas con cargas virales inferiores a las que se encuentran para otros virus influenza. Esto hace que la capacidad de detección de los kits sea menor en la gripe pandémica de 2009 que en las gripes estacionales de otros años. Este hecho ya ha sido descrito por Yang *et al.* en un estudio en el que se comparaban varios tests rápidos inmunocromatográficos frente a muestras infectadas con virus pandémico H1N1 y cepas con virus H3N2 (154). También en un estudio realizado por el CDC americano, se observó que la sensibilidad de diversos kits empleados disminuía paulatinamente según se utilizaban muestras con valores de Ct (Threshold Cycle) superiores a 20, es decir, con cargas virales más bajas (205).

En definitiva, el uso de estos test rápidos pudiera tener interés a la hora de dar respuesta a una gran demanda de peticiones de pruebas de detección de gripe A H1N1 2009, en un momento determinado, siempre que se tenga en mente que en ningún caso un valor negativo puede descartar una infección por este virus. Un valor positivo podría asumirse como tal, siempre que el contexto epidemiológico del momento así lo determinase y sin olvidar que estas pruebas no pueden distinguir entre la variante pandémica de la gripe A y las variantes estacionales.

## 6. Estudio de virus respiratorios

Las técnicas de biología molecular aparecidas recientemente han abierto un amplio abanico de posibilidades en el estudio de diversos patógenos humanos, especialmente en el diagnóstico de enfermedades producidas por virus. En este sentido, desde la aparición de las técnicas de PCR multiplex para la detección de virus respiratorios, se ha observado un aumento en el diagnóstico de estos virus en pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior (209;210). Gracias a la disponibilidad de estas técnicas hemos podido evaluar el papel que otros virus respiratorios, que producen síntomas similares a los de la gripe, han desempeñado durante la etapa pandémica. Para ello se analizaron tanto muestras positivas para el virus de la gripe A H1N1 2009, como muestras negativas. Las muestras positivas nos han permitido determinar la prevalencia de coinfecciones víricas y de su importancia a nivel clínico mientras que las muestras negativas han posibilitado la detección de diferentes virus respiratorios en pacientes con síndromes gripales y en los que inicialmente se sospechaba de infección por virus de la gripe A H1N1 2009.

Los porcentajes de muestras positivas para la gripe A H1N1 2009 coinfectadas con otro/s virus fueron superiores a los observados en otras publicaciones (37,3% en nuestras muestras frente al 10-20% de otros estudios) (211;212). Estas diferencias pueden ser debidas a las técnicas moleculares utilizadas en cada caso; en nuestro estudio se han empleado microarrays capaces de detectar 17 virus respiratorios diferentes, número superior al analizado en la mayoría de los trabajos publicados. A diferencia de otros autores, donde los rinovirus y enterovirus fueron los más prevalentes, en nuestro trabajo fueron diversos subtipos de virus de la influenza A los que predominantemente coinfectaron las muestras positivas para el virus pandémico. Existen publicaciones donde se han descrito ya casos de coinfección de virus pandémico H1N1 2009 con otros virus de la gripe A estacional (213;214). Algunos autores asocian estas coinfecciones con un posible incremento en la patogenicidad del virus pandémico tras recombinación con los otros virus influenza (215). Una de las hipótesis que intenta explicar la adquisición de resistencia a oseltamivir por parte de algunas cepas del virus pandémico sugiere que ésta se debió a la cocirculación de las



diferentes cepas de virus de la gripe A y al intercambio genético que se produjo entre ellas (216;217). En nuestro estudio encontramos una gran cantidad de coinfecciones de este tipo (en 16 pacientes), aunque solamente en uno de ellos se produjo una patología complicada (neumonía).

Seguidamente en importancia aparecieron los rinovirus y los virus de la parainfluenza (del I al IV). Los rinovirus han sido los mayoritariamente encontrados como coinfectantes en otros estudios (211;212;218). Los rinovirus se han considerado históricamente virus con bajo poder patógeno y que afectan principalmente a las vías respiratorias bajas; sin embargo en los últimos años se ha observado un incremento en el número de casos graves provocados por estos virus (219). Las coinfecciones de rinovirus con el virus respiratorio sincitial se han asociado a una mayor gravedad de la enfermedad (220). Sin embargo, Esper *et al.* observaron una menor gravedad en pacientes afectados de gripe A H1N1 2009 coinfectados con rinovirus frente a otros pacientes coinfectados con otro virus (211), en concreto en coinfecciones con coronavirus, donde constataron una mayor severidad. En nuestros pacientes no se detectó ninguna coinfección con coronavirus. El porcentaje de coinfecciones con virus de la parainfluenza fue muy parecido al de otros estudios (212;218;221). El papel de la coinfección viral para producir una mayor o menor severidad de la infección por gripe A H1N1 2009 está bajo discusión. Algunos autores sugieren la posibilidad de que diferentes virus puedan interferir con el virus pandémico y empeorar el proceso de la enfermedad (221). En este sentido, en otro estudio observaron una mayor gravedad de la infección en pacientes coinfectados frente a los mono infectados con virus pandémico, aunque no fueron capaces de demostrar esta asociación de manera significativa (211). Existe, sin embargo, otras publicaciones en las que no se encuentra ninguna relación entre coinfección con diferentes virus y mayor gravedad, y en las que, por tanto, se postula que no existe interferencia viral en pacientes coinfectados (222). En nuestro estudio, solo hubo un paciente con neumonía dentro de los coinfectados, por lo que nos resultó imposible sacar conclusiones. Serían necesarios más estudios con un número de muestras elevado para poder determinar de manera concluyente si la asociación de otros

virus con el de la gripe A H1N1 2009 puede provocar peor evolución de los cuadros clínicos.

Los pacientes estudiados con prueba para gripe A H1N1 2009 negativa presentaron resultados positivos para una gran diversidad de virus. En conjunto, los virus de la parainfluenza fueron los mayoritarios, coincidiendo con los datos de otros autores (222). Cabe destacar que en 4 de las 5 dobles infecciones observadas en este grupo de pacientes aparecen estos virus parainfluenza, fundamentalmente el tipo III, junto a otros virus respiratorios. El segundo virus en importancia dentro de nuestros pacientes fue el rinovirus, que es el virus que se encuentra más frecuentemente en población general (211;212;218;223). En población pediátrica, los virus respiratorios sincitiales son los patógenos más importantes, seguidos a considerable distancia por los rinovirus, adenovirus, bocavirus y metapneumovirus (224-226). En niños, los virus respiratorios sincitiales se han asociado a infecciones complicadas del tracto respiratorio inferior como neumonías, solos y en combinación con rinovirus (225). En nuestras muestras, el número de VRS detectados fue muy bajo, debido principalmente al bajo número de pacientes pediátricos analizados. Solo se observaron 5 neumonías, siendo diversos los virus que las provocaron, no pudiendo establecer una asociación entre los virus, sus interacciones, y una mayor gravedad en los cuadros clínicos. El resto de virus que detectamos se distribuyó de forma muy diversa con porcentajes muy parecidos entre sí (adenovirus, coronavirus, enterovirus y virus de la gripe C)

La gran variedad de virus observados en las diferentes muestras, sugiere la dificultad en la identificación de un patógeno determinado ante la presencia de un síndrome pseudogripal basándose únicamente en criterios clínicos. La presencia de diversos virus en una única muestra clínica no se ha podido asociar aún a una patología más grave o a una peor evolución de la enfermedad basal. Son necesarios pues, estudios más amplios que permitan dilucidar el papel que los distintos virus respiratorios desempeñan en las patologías observadas.

Finalmente y para concluir, hemos de mencionar la dificultad encontrada a la hora de realizar el procesamiento y tratamiento de los datos de este

documento. El desconocimiento y la alarma social creada a raíz de los primeros casos acontecidos en los primeros meses del año 2009, provocó que la forma de actuación ante esta nueva pandemia resultara precipitada y diversa en multitud de ocasiones. De ahí la gran cantidad de limitaciones que nos encontramos a la hora de la recogida de datos clínico-epidemiológicos, y la falta de un criterio común y específico para comparar las diversas pruebas diagnósticas.

Una vez declarado el final de la pandemia por la OMS, podemos afirmar que, afortunadamente, las fatales consecuencias previstas en un principio por los expertos no se han llegado a producir. La pandemia gripal provocada por el virus de la influenza A H1N1 2009 ha cursado, por regla general, de manera similar a las epidemias estacionales de virus gripales anteriores, salvo algunas particularidades, como la época de aparición y la mayor afectación en niños y adultos jóvenes. La gravedad de la infección puede ser debida, según sugieren los datos de nuestro estudio, a multitud de variables no bien establecidas aún, y en donde el valor de la carga viral no desempeña un papel primordial.

## **Conclusiones**



1.- La gravedad de la enfermedad provocada por el virus de la gripe A H1N1 2009 se asocia a factores intrínsecos del paciente, principalmente enfermedades previas o factores inmunológicos, y extrínsecos como la coinfección con patógenos bacterianos, pero no se relaciona con valores altos de carga viral.

2.- En general, los datos clínico-epidemiológicos extraídos del procesamiento de las muestras sospechosas de gripe A H1N1 2009 recibidas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos fueron coincidentes con los datos observados en otros estudios y otras áreas geográficas.

3.- Padecer asma, poseer malestar general y dolor de garganta en el momento del diagnóstico, y ser menor de 65 años, son factores determinantes de infección por gripe A H1N1 2009 en la población de estudio.

4.- Las mujeres embarazadas poseen un mayor riesgo de infección, aunque no es un factor asociado a una peor evolución de la enfermedad.

5.- Las cargas virales bajas (menores de 2000 cop/ml) están ligadas a pacientes con comorbilidades mayores y con sintomatología sistémica (malestar general) en el momento del diagnóstico.

6.- Los pacientes trasplantados renales tienen mayor probabilidad de poseer valores de carga viral por encima de 2000 cop/ml.

7.- La principal complicación sufrida por los pacientes con gripe A H1N1 2009 fue la neumonía, la cual se asocia a personas con antecedentes de enfermedades neurológicas, comorbilidades mayores y diabetes tipo I/II. A su vez, aquellas personas que presentaron una coinfección bacteriana durante el transcurso de la infección viral poseen mayor riesgo de sufrir dicha complicación.

8.- La sintomatología provocada por el virus de la gripe A H1N1 2009 puede ser fácilmente confundida con la producida por otros virus y bacterias, por lo que el diagnóstico definitivo de la enfermedad debe ser necesariamente microbiológico.

9.- Las coinfecciones con otros microorganismos fueron bastante frecuentes en nuestros pacientes infectados con gripe A H1N1 2009, observándose un alto número de ellas con otros subtipos de virus de la influenza A y de la influenza C, así como con *S. pneumoniae*.

10. Dentro de las diversas técnicas de detección de gripe A H1N1 2009 que se evaluaron, las moleculares fueron las que mejores resultados mostraron.

11. En general, la infección provocada por el virus de la gripe A H1N1 2009 no ha sido tan grave como se temía inicialmente, comportándose como un virus epidémico gripal similar al de años anteriores, si bien es cierto que ha presentado particularidades tales como la época de incidencia y la mayor afectación en niños y adultos jóvenes.

## **Bibliografía**





- (1) Romero VJ, Rubio AM, Corral O, Pacheco S, Agudo E, Picazo JJ. [Community-acquired respiratory infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997 Jun;15(6):289-98.
- (2) Picazo JJ, Perez-Cecilia E, Herreras A. [Respiratory infections outside the hospital. DIRA study]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003 Oct;21(8):410-6.
- (3) Huovinen P, Cars O. Control of antimicrobial resistance: time for action. The essentials of control are already well known. *BMJ* 1998 Sep 5;317(7159):613-4.
- (4) Fernandez RR, Granizo JJ, Soriano F. [Pharmacodynamics of antibiotics in otitis media]. *Med Clin (Barc)* 2000 Jun 10;115(2):70-2.
- (5) Oteo J, Alos JI, Gomez-Garces JL. [Current in vitro sensitivity of the most frequent bacterial respiratory pathogens: clinical implications]. *Med Clin (Barc)* 2001 Apr 21;116(14):541-9.
- (6) Barberan J, Gimenez MJ, Aguilar L, Prieto J. [Scientific evidence and global conception of empirical treatment of lower respiratory tract infections in the community]. *Rev Esp Quimioter* 2004 Dec;17(4):317-24.
- (7) García Rodríguez J.A, Picazo de la Garza J.J. *Compendio de Microbiología Médica*. Madrid: Harcourt; 2003.
- (8) Mensa J., Gatell J.M., García-Sánchez J.E, Letang E., López-Suñé E. *Guía de terapéutica antimicrobiana 2010*. Barcelona: Antares; 2010.
- (9) Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA. 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clin Proc* 2010 Jan;85(1):64-76.
- (10) Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* 2006 Apr 21;312(5772):380-2.

- (11) Boni MF. Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 2008 Jul 18;26 Suppl 3:C8-14.
- (12) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009 Jun 18;459(7249):931-9.
- (13) Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 2009 Jul;45(3):174-8.
- (14) García Rodríguez J.A, García Sánchez J.E, Gobernado M, Picazo J.J, Prieto J. *Antimicrobianos en Medicina*. 2ª ed. Barcelona: Prous Science S.A; 2006.
- (15) de Juanes Pardo J.R, Arrazola Martínez M.P. *Viajes Internacionales: recomendaciones generales y vacunas*. 2 ed. Madrid: 2005.
- (16) Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med* 2007 Feb 15;356(7):685-96.
- (17) Schotsaert M, De FM, Fiers W, Saelens X. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines* 2009 Apr;8(4):499-508.
- (18) Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* 2009 Jul 16;361(3):279-85.
- (19) Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 1991 Jul;65(7):3704-14.

- (20) Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Genetic relatedness between A/Swine/Iowa/15/30(H1N1) and human influenza viruses. *Virology* 1984 Nov;139(1):194-8.
- (21) Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. *Arch Virol* 1994;134(1-2):17-28.
- (22) Scholtissek C, Rohde W, Von H, V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 1978 Jun 1;87(1):13-20.
- (23) KAYE D, ROSENBLUTH M, HOOK EW, KILBOURNE ED. Endemic influenza. II. The nature of the disease in the post-pandemic period. *Am Rev Respir Dis* 1962 Jan;85:9-21.
- (24) Gaydos JC, Top FH, Jr., Hodder RA, Russell PK. Swine influenza a outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg Infect Dis* 2006 Jan;12(1):23-8.
- (25) KILBOURNE ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 2006 Jan;12(1):9-14.
- (26) Scholtissek C, Von H, V, Rott R. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1). *Virology* 1978 Sep;89(2):613-7.
- (27) Swine influenza A (H1N1) infection in two children--Southern California, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Apr 24;58(15):400-2.
- (28) Update: swine influenza A (H1N1) infections--California and Texas, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 May 1;58(16):435-7.

- (29) Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 May 8;58(17):467-70.
- (30) Chan M. World now at the start of 2009 influenza pandemic. WHO 2009 Available from: URL: [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/).
- (31) Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. N Engl J Med 2009 Jun 18;360(25):2616-25.
- (32) Vincent AL, Lager KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, et al. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. Vet Microbiol 2006 Dec 20;118(3-4):212-22.
- (33) Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 2009 Jul 10;325(5937):197-201.
- (34) Baker MG, Wilson N, Huang QS, Paine S, Lopez L, Bandaranayake D, et al. Pandemic influenza A(H1N1)v in New Zealand: the experience from April to August 2009. Euro Surveill 2009;14(34).
- (35) Raffo L. [Influenza A(H1N1) epidemic in Argentina. Experience in a National General Hospital (Hospital Nacional Alejandro Posadas)]. Medicina (B Aires) 2009;69(4):393-423.
- (36) Jain R, Goldman RD. Novel influenza A(H1N1): clinical presentation, diagnosis, and management. Pediatr Emerg Care 2009 Nov;25(11):791-6.

- (37) Use of influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. MMWR Recomm Rep 2009 Aug 28;58(RR-10):1-8.
- (38) Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med 2009 Jun 18;360(25):2605-15.
- (39) Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus infection - California, April-May, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 May 22;58(19):536-41.
- (40) Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. Cell Host Microbe 2010 Feb 18;7(2):103-14.
- (41) Rello J, Rodriguez A, Ibanez P, Socias L, Cebrian J, Marques A, et al. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1)v in Spain. Crit Care 2009;13(5):R148.
- (42) Vaillant L, La RG, Tarantola A, Barboza P. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. Euro Surveill 2009;14(33).
- (43) Intensive-care patients with severe novel influenza A (H1N1) virus infection - Michigan, June 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 Jul 17;58(27):749-52.
- (44) Zimmer SM, Crevar CJ, Carter DM, Stark JH, Giles BM, Zimmerman RK, et al. Seroprevalence following the second wave of Pandemic 2009 H1N1 influenza in Pittsburgh, PA, USA. PLoS One 2010;5(7):e11601.

- (45) Mathematical modelling of the pandemic H1N1 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 Aug 21;84(34):341-8.
- (46) Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 2009 Jun 19;324(5934):1557-61.
- (47) Wilson N, Baker MG. The emerging influenza pandemic: estimating the case fatality ratio. *Euro Surveill* 2009 Jul 2;14(26).
- (48) Presanis AM, Lipsitch M, Daniela DA, Hagy A, Reed C, Riley S, et al. The severity of pandemic H1N1 influenza in the United States, April -- July 2009. *PLoS Curr* 2009;1:RRN1042.
- (49) Donaldson LJ, Rutter PD, Ellis BM, Greaves FE, Mytton OT, Pebody RG, et al. Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ* 2009;339:b5213.
- (50) Transmission dynamics and impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 Nov 13;84(46):481-4.
- (51) Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R, et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA* 2009 Nov 4;302(17):1896-902.
- (52) Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 2009 Nov 12;361(20):1935-44.
- (53) Dominguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* 2009 Nov 4;302(17):1880-7.

- (54) Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 2009 Nov 4;302(17):1872-9.
- (55) Webb SA, Pettila V, Seppelt I, Bellomo R, Bailey M, Cooper DJ, et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 2009 Nov 12;361(20):1925-34.
- (56) Navarro-Mari JM, Mayoral-Cortes JM, Perez-Ruiz M, Rodriguez-Bano J, Carratala J, Gallardo-Garcia V. [Influenza a (H1N1) virus infection in humans: review to 30th October 2009]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010 Aug;28(7):446-52.
- (57) Subcomité de Vigilancia. Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a una pandemia de gripe. Vigilancia epidemiológica de los casos humanos graves de infección por virus pandémico (H1N1) en España Informe de situación a fecha 24.09.2009. Ministerio de Sanidad y Política Social 2009 Available from: URL: [http://www.msps.es/profesionales/saludPublica/gripeA/docs/Informe\\_Situacion\\_240909.pdf](http://www.msps.es/profesionales/saludPublica/gripeA/docs/Informe_Situacion_240909.pdf).
- (58) Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009 Aug 20;460(7258):1021-5.
- (59) Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 2009 Jul 24;325(5939):484-7.
- (60) Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* 2009 Nov 12;361(20):1945-52.



- (61) Chen H, Wang Y, Liu W, Zhang J, Dong B, Fan X, et al. Serologic survey of pandemic (H1N1) 2009 virus, Guangxi Province, China. *Emerg Infect Dis* 2009 Nov;15(11):1849-50.
- (62) Xing Z, Cardona CJ. Preexisting immunity to pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis* 2009 Nov;15(11):1847-9.
- (63) Cauchemez S, Donnelly CA, Reed C, Ghani AC, Fraser C, Kent CK, et al. Household transmission of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in the United States. *N Engl J Med* 2009 Dec 31;361(27):2619-27.
- (64) Cao B, Li XW, Mao Y, Wang J, Lu HZ, Chen YS, et al. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *N Engl J Med* 2009 Dec 24;361(26):2507-17.
- (65) Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med* 2010 Jan 7;362(1):45-55.
- (66) Perez-Padilla R, Rosa-Zamoni D, Ponce de LS, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 2009 Aug 13;361(7):680-9.
- (67) Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, da Silva LF, Schout D, Galas FR, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Jan 1;181(1):72-9.
- (68) Shieh WJ, Blau DM, Denison AM, DeLeon-Carnes M, Adem P, Bhatnagar J, et al. 2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. *Am J Pathol* 2010 Jul;177(1):166-75.

- (69) Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999 Dec;26(3-4):189-95.
- (70) Beadling C, Slifka MK. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Curr Opin Infect Dis* 2004 Jun;17(3):185-91.
- (71) Berendt RF, Jaax NK. Effect of prior influenza virus infections on susceptibility of AKR/J mice to respiratory challenge with *Legionella pneumophila*. *J Lab Clin Med* 1985 Jan;105(1):124-31.
- (72) McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 2006 Jul;19(3):571-82.
- (73) Seki M, Higashiyama Y, Tomono K, Yanagihara K, Ohno H, Kaneko Y, et al. Acute infection with influenza virus enhances susceptibility to fatal pneumonia following *Streptococcus pneumoniae* infection in mice with chronic pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* 2004 Jul;137(1):35-40.
- (74) Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med* 2008 May;14(5):558-64.
- (75) Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 2010 May 6;362(18):1708-19.
- (76) Li IW, Hung IF, To KK, Chan KH, Wong SS, Chan JF, et al. The natural viral load profile of patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) and the effect of oseltamivir treatment. *Chest* 2010 Apr;137(4):759-68.
- (77) To KK, Chan KH, Li IW, Tsang TY, Tse H, Chan JF, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* 2010 Jan;82(1):1-7.

- (78) Li CC, Wang L, Eng HL, You HL, Chang LS, Tang KS, et al. Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children. *Emerg Infect Dis* 2010 Aug;16(8):1265-72.
- (79) Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honein MA. Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med* 2010 Jan 7;362(1):27-35.
- (80) Archer B, Cohen C, Naidoo D, Thomas J, Makunga C, Blumberg L, et al. Interim report on pandemic H1N1 influenza virus infections in South Africa, April to October 2009: epidemiology and factors associated with fatal cases. *Euro Surveill* 2009;14(42).
- (81) Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLoS One* 2010;5(3):e9694.
- (82) Geneve: World Health Organization. CDC protocols of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1). CDC 2009 Available from: URL: [www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol\\_20090428.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf)
- (83) Perez J, Culebras E, Baos E, Alvarez-Buylla A, Rodriguez-Avial I, Candel FJ, et al. [Clinical use of rapid assays for the detection of influenza An/H1N1.]. *Rev Esp Quimioter* 2010 Dec;23(4):215-6.
- (84) Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Muller M, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 2009 Oct;15(10):1662-4.
- (85) Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009 Oct 1;49(7):1090-3.

- (86) Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance on specimen collection, processing and testing for patients with suspected novel influenza A (H1N1) virus infection (consultado el 24/10/2011)<sup>[10]</sup>. CDC 2009 Available from: URL: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/specimencollection.htm>
- (87) Blyth CC, Iredell JR, Dwyer DE. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009 Dec 17;361(25):2493.
- (88) Update on oseltamivir-resistant pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: January 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 Feb 5;85(6):37-40.
- (89) Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis--North Carolina, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Sep 11;58(35):969-72.
- (90) Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients - Seattle, Washington, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Aug 21;58(32):893-6.
- (91) Gaur AH, Bagga B, Barman S, Hayden R, Lamptey A, Hoffman JM, et al. Intravenous zanamivir for oseltamivir-resistant 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2010 Jan 7;362(1):88-9.
- (92) Kidd IM, Down J, Nastouli E, Shulman R, Grant PR, Howell DC, et al. H1N1 pneumonitis treated with intravenous zanamivir. *Lancet* 2009 Sep 19;374(9694):1036.
- (93) Le QM, Wertheim HF, Tran ND, van Doorn HR, Nguyen TH, Horby P. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2010 Jan 7;362(1):86-7.
- (94) World Health Organization. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic (H1N1) 2009 influenza and other influenza

- viruses. WHO 2010Available from: URL:  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mnqt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mnqt.pdf)
- (95) Harper SA, Bradley JS, Englund JA, File TM, Gravenstein S, Hayden FG, et al. Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009 Apr 15;48(8):1003-32.
- (96) Food and Drug Administration. Emergence use of tamiflu in infants less than 1 year of age. FDA 2009Available from: URL:  
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm183870.htm>
- (97) Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. Lancet 2009 Aug 8;374(9688):451-8.
- (98) WHO. WHO recommendations on pandemic (H1N1) 2009 vaccines. WHO 2009Available from: URL:  
[http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1\\_vaccine\\_20090713/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_vaccine_20090713/en/index.html)
- (99) WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. WHO 2010Available from: URL:  
[http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2010\\_11north/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2010_11north/en/index.html)
- (100) Comunidad de Madrid. Documentos operativos para la atención sanitaria. Norma para la toma de muestras. 03/07/09. Salud Madrid 2009Available from: URL:  
<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application>

[tion%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3D007-+NORMAS+PARA+LA+TOMA+DE+MUESTRAS+03-07-09.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220573388611&ssbinary=true](http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3D007-+NORMAS+PARA+LA+TOMA+DE+MUESTRAS+03-07-09.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220573388611&ssbinary=true)

- (101) Comunidad de Madrid. Documentos de referencia en la Comunidad de Madrid. Criterios para toma de muestras. 21/08/09. Salud Madrid 2009Available from: URL:

<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3D006-criterios++toma+de+muestras+21-08-09.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220573388594&ssbinary=true>

- (102) Comunidad de Madrid.Conserjería de Sanidad. Plan de Preparación y Respuesta ante una Pandemia de Gripe de la Comunidad de Madrid. Versión 07.05.2009. Salud Madrid 2009Available from: URL:

<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DPlan+Pandemia+Madrid+07+05+2009.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220500317821&ssbinary=true>

- (103) Comunidad de Madrid. Documentos de referencia en la Comunidad de Madrid. Definición operativa clínica de caso de gripe AH1N1 2009. Salud Madrid 2009Available from: URL:

[http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%](http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DDefinicion+operativa+clinica+de+caso+de+gripe+AH1N1+2009.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220500317821&ssbinary=true)

[3DDEFINICI%C3%93N+DE+CASO+SOSPECHOSO+DE+GRIPE+A+170909.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1220589406057&ssbinary=true](#)

- (104) Brandsaeter BJ, Pillgram M, Berild D, Kjekshus H, Kran AM, Bergersen BM. Hospitalised patients with suspected 2009 H1N1 Influenza A in a hospital in Norway, July - December 2009. BMC Infect Dis 2011;11:75.
- (105) Bryant PA, Tebruegge M, Papadakis G, Clarke C, Barnett P, Daley AJ, et al. Clinical and microbiologic features associated with novel swine-origin influenza A pandemic 2009 (H1N1) virus in children: a prospective cohort study. Pediatr Infect Dis J 2010 Aug;29(8):694-8.
- (106) Lera CE, Worner NT, Sancosmed RM, Fabregas MA, Casquero CA, Cebrian RR. [Impact of the 2009 influenza A (H1N1) virus pandemic on the emergency department of a tertiary hospital.]. An Pediatr (Barc ) 2011 Mar 18.
- (107) Supervia A, Del BF, Maldonado G, Pallas O, Aguirre A, Vilaplana C, et al. [Predictive factors of 2009 H1N1 virus infection in patients with influenza syndrome.]. Rev Esp Quimioter 2011 Mar;24(1):25-31.
- (108) Update: influenza activity - United States, 2009-10 season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010 Jul 30;59(29):901-8.
- (109) Ertek M, Durmaz R, Guldemir D, Altas AB, Albayrak N, Korukluoglu G. Epidemiological, demographic, and molecular characteristics of laboratory-confirmed pandemic influenza A (H1N1) virus infection in Turkey, May 15-November 30, 2009. Jpn J Infect Dis 2010 Jul;63(4):239-45.
- (110) Pebody RG, McLean E, Zhao H, Cleary P, Bracebridge S, Foster K, et al. Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and mortality in the United

- Kingdom: risk factors for death, April 2009 to March 2010. *Euro Surveill* 2010 May 20;15(20).
- (111) Yu H, Feng Z, Uyeki TM, Liao Q, Zhou L, Feng L, et al. Risk factors for severe illness with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *Clin Infect Dis* 2011 Feb;52(4):457-65.
- (112) Bewick T, Myles P, Greenwood S, Nguyen-Van-Tam JS, Brett SJ, Semple MG, et al. Clinical and laboratory features distinguishing pandemic H1N1 influenza-related pneumonia from interpandemic community-acquired pneumonia in adults. *Thorax* 2011 Mar;66(3):247-52.
- (113) Influenza A(H1N1)v virus infections in Belgium, May-June 2009. *Euro Surveill* 2009 Jul 16;14(28).
- (114) Preliminary analysis of influenza A(H1N1)v individual and aggregated case reports from EU and EFTA countries. *Euro Surveill* 2009 Jun 11;14(23):19238.
- (115) New influenza A(H1N1) virus infections in Spain, April-May 2009. *Euro Surveill* 2009 May 14;14(19).
- (116) Virological surveillance of human cases of influenza A(H1N1)v virus in Italy: preliminary results. *Euro Surveill* 2009 Jun 18;14(24).
- (117) de Silva UC, Warachit J, Waicharoen S, Chittaganpitch M. A preliminary analysis of the epidemiology of influenza A(H1N1)v virus infection in Thailand from early outbreak data, June-July 2009. *Euro Surveill* 2009 Aug 6;14(31).
- (118) Gomez J, Munayco C, Arrasco J, Suarez L, Laguna-Torres V, Aguilar P, et al. Pandemic influenza in a southern hemisphere setting: the experience in Peru from May to September, 2009. *Euro Surveill* 2009;14(42).



- (119) Hahne S, Donker T, Meijer A, Timen A, van SJ, Osterhaus A, et al. Epidemiology and control of influenza A(H1N1)v in the Netherlands: the first 115 cases. *Euro Surveill* 2009 Jul 9;14(27).
- (120) Klein SL, Passaretti C, Anker M, Olukoya P, Pekosz A. The impact of sex, gender and pregnancy on 2009 H1N1 disease. *Biol Sex Differ* 2010;1(1):5.
- (121) Update on influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Oct 9;58(39):1100-1.
- (122) Reed C, Angulo FJ, Sverdlow DL, Lipsitch M, Meltzer MI, Jernigan D, et al. Estimates of the prevalence of pandemic (H1N1) 2009, United States, April-July 2009. *Emerg Infect Dis* 2009 Dec;15(12):2004-7.
- (123) Riera M, Payeras A, Marcos MA, Viasus D, Farinas MC, Segura F, et al. Clinical presentation and prognosis of the 2009 H1N1 influenza A infection in HIV-1-infected patients: a Spanish multicenter study. *AIDS* 2010 Oct 23;24(16):2461-7.
- (124) Hackett S, Hill L, Patel J, Ratnaraja N, Ifeyinwa A, Farooqi M, et al. Clinical characteristics of paediatric H1N1 admissions in Birmingham, UK. *Lancet* 2009 Aug 22;374(9690):605.
- (125) Shimada T, Gu Y, Kamiya H, Komiya N, Odaira F, Sunagawa T, et al. Epidemiology of influenza A(H1N1)v virus infection in Japan, May-June 2009. *Euro Surveill* 2009 Jun 18;14(24).
- (126) Halasa NB. Update on the 2009 pandemic influenza A H1N1 in children. *Curr Opin Pediatr* 2010 Feb;22(1):83-7.
- (127) Lister P, Reynolds F, Parslow R, Chan A, Cooper M, Plunkett A, et al. Swine-origin influenza virus H1N1, seasonal influenza virus, and critical illness in children. *Lancet* 2009 Aug 22;374(9690):605-7.

- (128) Surveillance for pediatric deaths associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection - United States, April-August 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 Sep 4;58(34):941-7.
- (129) Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 Oct 2;58(38):1071-4.
- (130) Gilsdorf A, Poggensee G. Influenza A(H1N1)v in Germany: the first 10,000 cases. Euro Surveill 2009;14(34).
- (131) Brundage JF, Shanks GD. Deaths from bacterial pneumonia during 1918-19 influenza pandemic. Emerg Infect Dis 2008 Aug;14(8):1193-9.
- (132) Guarner J, Packard MM, Nolte KB, Paddock CD, Shieh WJ, Tondella ML, et al. Usefulness of immunohistochemical diagnosis of streptococcus pneumoniae in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens compared with culture and gram stain techniques. Am J Clin Pathol 2007 Apr;127(4):612-8.
- (133) Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. J Infect Dis 2008 Oct 1;198(7):962-70.
- (134) Madhi SA, Klugman KP. A role for Streptococcus pneumoniae in virus-associated pneumonia. Nat Med 2004 Aug;10(8):811-3.
- (135) Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, et al. Streptococcus pneumoniae coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. PLoS One 2009;4(12):e8540.
- (136) Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009 May 22;58(19):521-4.

- (137) Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda C, Hernandez M, et al. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2009 Aug 13;361(7):674-9.
- (138) Levy-Bruhl D, Vaux S. Modified surveillance of influenza A(H1N1)v virus infections in France. *Euro Surveill* 2009 Jul 23;14(29).
- (139) Oliveira W, Carmo E, Penna G, Kuchenbecker R, Santos H, Araujo W, et al. Pandemic H1N1 influenza in Brazil: analysis of the first 34,506 notified cases of influenza-like illness with severe acute respiratory infection (SARI). *Euro Surveill* 2009;14(42).
- (140) Ngaosuwankul N, Noisumdaeng P, Komolsiri P, Pooruk P, Chokephaibulkit K, Chotpitayasunondh T, et al. Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Viol J* 2010;7:75.
- (141) Novel influenza A (H1N1) virus infections in three pregnant women - United States, April-May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 May 15;58(18):497-500.
- (142) 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infections - Chicago, Illinois, April-July 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Aug 28;58(33):913-8.
- (143) Denholm JT, Gordon CL, Johnson PD, Hewagama SS, Stuart RL, Aboltins C, et al. Hospitalised adult patients with pandemic (H1N1) 2009 influenza in Melbourne, Australia. *Med J Aust* 2010 Jan 18;192(2):84-6.
- (144) Echevarria-Zuno S, Mejia-Arangure JM, Mar-Obeso AJ, Grajales-Muniz C, Robles-Perez E, Gonzalez-Leon M, et al. Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis. *Lancet* 2009 Dec 19;374(9707):2072-9.

- (145) Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, Callaghan WM, et al. Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA* 2010 Apr 21;303(15):1517-25.
- (146) 2009 pandemic influenza A (H1N1) in pregnant women requiring intensive care - New York City, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010 Mar 26;59(11):321-6.
- (147) Creanga AA, Johnson TF, Graitcer SB, Hartman LK, Al-Samarrai T, Schwarz AG, et al. Severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pregnant women. *Obstet Gynecol* 2010 Apr;115(4):717-26.
- (148) Hewagama S, Walker SP, Stuart RL, Gordon C, Johnson PD, Friedman ND, et al. 2009 H1N1 influenza A and pregnancy outcomes in Victoria, Australia. *Clin Infect Dis* 2010 Mar 1;50(5):686-90.
- (149) Lim ML, Chong CY, Tee WS, Lim WY, Chee JJ. Influenza A/H1N1 (2009) infection in pregnancy--an Asian perspective. *BJOG* 2010 Apr;117(5):551-6.
- (150) Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004 Feb 21;363(9409):617-9.
- (151) Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004 Mar;29(3):179-88.
- (152) de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006 Oct;12(10):1203-7.

- (153) Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect* 2010 Apr;16(4):317-21.
- (154) Yang JR, Lo J, Ho YL, Wu HS, Liu MT. Pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza infection in the human population show different distributions of viral loads, which substantially affect the performance of rapid influenza tests. *Virus Res* 2011 Jan;155(1):163-7.
- (155) Panning M, Eickmann M, Landt O, Monazahian M, Olschlager S, Baumgarte S, et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2009 Sep 10;14(36).
- (156) To KK, Chan KH, Li IW, Tsang TY, Tse H, Chan JF, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* 2010 Jan;82(1):1-7.
- (157) Lee N, Chan PK, Hui DS, Rainer TH, Wong E, Choi KW, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis* 2009 Aug 15;200(4):492-500.
- (158) Chan KH, Peiris JS, Lim W, Nicholls JM, Chiu SS. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *J Clin Virol* 2008 May;42(1):65-9.
- (159) Giannella M, Alonso M, Garcia d, V, Roa PL, Catalan P, Padilla B, et al. Prolonged viral shedding in pandemic influenza A(H1N1): clinical significance and viral load analysis in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2010 Oct 14.
- (160) Kumar D, Morris MI, Kotton CN, Fischer SA, Michaels MG, Allen U, et al. Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2010 Jan;10(1):18-25.

- (161) Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med* 1986 Jul 10;315(2):77-81.
- (162) Lee N, Allen Chan KC, Hui DS, Ng EK, Wu A, Chiu RW, et al. Effects of early corticosteroid treatment on plasma SARS-associated Coronavirus RNA concentrations in adult patients. *J Clin Virol* 2004 Dec;31(4):304-9.
- (163) Ling LM, Chow AL, Lye DC, Tan AS, Krishnan P, Cui L, et al. Effects of early oseltamivir therapy on viral shedding in 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Clin Infect Dis* 2010 Apr 1;50(7):963-9.
- (164) Bermejo-Martin JF, Ortiz de LR, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramirez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care* 2009;13(6):R201.
- (165) Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 2008 Dec;226:57-79.
- (166) de Castro IF, Guzman-Fulgencio M, Garcia-Alvarez M, Resino S. First evidence of a pro-inflammatory response to severe infection with influenza virus H1N1. *Crit Care* 2010;14(1):115.
- (167) Beadling C, Slifka MK. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Curr Opin Infect Dis* 2004 Jun;17(3):185-91.
- (168) Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2010 Feb 18;7(2):103-14.

- (169) Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Baziaka F, Koutoukas P, Savva A, et al. Effect of the novel influenza A (H1N1) virus in the human immune system. *PLoS One* 2009;4(12):e8393.
- (170) Li CC, Wang L, Eng HL, You HL, Chang LS, Tang KS, et al. Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children. *Emerg Infect Dis* 2010 Aug;16(8):1265-72.
- (171) Wen Y, Deng BC, Zhou Y, Wang Y, Cui W, Wang W, et al. Immunological features in patients with pneumonitis due to influenza A H1N1 infection. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(1):44-50.
- (172) Arankalle VA, Lole KS, Arya RP, Tripathy AS, Ramdasi AY, Chadha MS, et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One* 2010;5(10).
- (173) Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 2010 May 6;362(18):1708-19.
- (174) Blyth CC, Iredell JR, Dwyer DE. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009 Dec 17;361(25):2493.
- (175) Nguyen-Van-Tam JS, Openshaw PJ, Hashim A, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, et al. Risk factors for hospitalisation and poor outcome with pandemic A/H1N1 influenza: United Kingdom first wave (May-September 2009). *Thorax* 2010 Jul;65(7):645-51.
- (176) Mu YP, Zhang ZY, Chen XR, Xi XH, Lu YF, Tang YW, et al. Clinical features, treatments and prognosis of the initial cases of pandemic influenza H1N1 2009 virus infection in Shanghai China. *QJM* 2010 May;103(5):311-7.

- (177) Gill JR, Sheng ZM, Ely SF, Guinee DG, Beasley MB, Suh J, et al. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Feb;134(2):235-43.
- (178) Harms PW, Schmidt LA, Smith LB, Newton DW, Pletneva MA, Walters LL, et al. Autopsy findings in eight patients with fatal H1N1 influenza. *Am J Clin Pathol* 2010 Jul;134(1):27-35.
- (179) Patients hospitalized with 2009 pandemic influenza A (H1N1) - New York City, May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010 Jan 8;58(51):1436-40.
- (180) Estenssoro E, Rios FG, Apezteguia C, Reina R, Neira J, Ceraso DH, et al. Pandemic 2009 influenza A in Argentina: a study of 337 patients on mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Jul 1;182(1):41-8.
- (181) Fielding J, Higgins N, Gregory J, Grant K, Catton M, Bergeri I, et al. Pandemic H1N1 influenza surveillance in Victoria, Australia, April - September, 2009. *Euro Surveill* 2009;14(42).
- (182) Fleege L, Hallberg E, Morin C, Danila R, Lynfield R. Novel H1N1 influenza hospitalizations: Minneapolis-St. Paul metropolitan area, 2008-2009. *Minn Med* 2009 Nov;92(11):38-42.
- (183) Fuhrman C, Bonmarin I, Paty AC, Duport N, Chiron E, Lucas E, et al. Severe hospitalised 2009 pandemic influenza A(H1N1) cases in France, 1 July-15 November 2009. *Euro Surveill* 2010 Jan 14;15(2).
- (184) Riquelme R, Riquelme M, Rioseco ML, Inzunza C, Gomez Y, Contreras C, et al. Characteristics of hospitalised patients with 2009 H1N1 influenza in Chile. *Eur Respir J* 2010 Oct;36(4):864-9.
- (185) Tulloch F, Correa R, Guerrero G, Samaniego R, Garcia M, Pascale JM, et al. Profile of the first cases hospitalized due to influenza A (H1N1) in



- Panama City, Panama. May-June 2009. *J Infect Dev Ctries* 2009;3(11):811-6.
- (186) van 't Klooster TM, Wielders CC, Donker T, Isken L, Meijer A, van den Wijngaard CC, et al. Surveillance of hospitalisations for 2009 pandemic influenza A(H1N1) in the Netherlands, 5 June - 31 December 2009. *Euro Surveill* 2010 Jan 14;15(2).
- (187) Xiao H, Lu SH, Ou Q, Chen YY, Huang SP. Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus infection: Shanghai, June - July 2009. *Chin Med J (Engl )* 2010 Feb 20;123(4):401-5.
- (188) de Torres JP, Cote CG, Lopez MV, Casanova C, Diaz O, Marin JM, et al. Sex differences in mortality in patients with COPD. *Eur Respir J* 2009 Mar;33(3):528-35.
- (189) Langhammer A, Johnsen R, Gulsvik A, Holmen TL, Bjerner L. Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2003 Jun;21(6):1017-23.
- (190) McCallister JW, Mastronarde JG. Sex differences in asthma. *J Asthma* 2008 Dec;45(10):853-61.
- (191) Schatz M, Clark S, Camargo CA, Jr. Sex differences in the presentation and course of asthma hospitalizations. *Chest* 2006 Jan;129(1):50-5.
- (192) Campbell A, Rodin R, Kropp R, Mao Y, Hong Z, Vachon J, et al. Risk of severe outcomes among patients admitted to hospital with pandemic (H1N1) influenza. *CMAJ* 2010 Mar 9;182(4):349-55.
- (193) Zarychanski R, Stuart TL, Kumar A, Doucette S, Elliott L, Kettner J, et al. Correlates of severe disease in patients with 2009 pandemic influenza (H1N1) virus infection. *CMAJ* 2010 Feb 23;182(3):257-64.

- (194) Harris JW. Influenza occurring in pregnant women. JAMA 1919;72:978-80.
- (195) FREEMAN DW, BARNO A. Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1959 Dec;78:1172-5.
- (196) Dodds L, McNeil SA, Fell DB, Allen VM, Coombs A, Scott J, et al. Impact of influenza exposure on rates of hospital admissions and physician visits because of respiratory illness among pregnant women. CMAJ 2007 Feb 13;176(4):463-8.
- (197) Neuzil KM, Reed GW, Mitchel EF, Simonsen L, Griffin MR. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. Am J Epidemiol 1998 Dec 1;148(11):1094-102.
- (198) Beersma MF, Verjans GM, Metselaar HJ, Osterhaus AD, Berrington WR, van Doornum GJ. Quantification of viral DNA and liver enzymes in plasma improves early diagnosis and management of herpes simplex virus hepatitis. J Viral Hepat 2011 Apr;18(4):e160-e166.
- (199) Fujiwara K, Kojima H, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Omata M, et al. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. J Med Virol 2011 Feb;83(2):201-7.
- (200) Houben ML, Coenjaerts FE, Rossen JW, Belderbos ME, Hofland RW, Kimpen JL, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. J Med Virol 2010 Jul;82(7):1266-71.
- (201) Quinlivan ML, Ayres KL, Kelly PJ, Parker SP, Scott FT, Johnson RW, et al. Persistence of varicella-zoster virus viraemia in patients with herpes zoster. J Clin Virol 2011 Feb;50(2):130-5.
- (202) Perez-Ruiz M, Navarro-Mari JM, Bautista-Marin MF, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gamez S, Camacho AG, et al. Development and

- preliminary evaluation of a rapid oligochromatographic assay for specific detection of new human influenza A H1N1 virus. *J Clin Microbiol* 2010 May;48(5):1801-5.
- (203) de la Tabla VO, Antequera P, Masia M, Ros P, Martin C, Gazquez G, et al. Clinical evaluation of rapid point-of-care testing for detection of novel influenza A (H1N1) virus in a population-based study in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010 Sep;16(9):1358-61.
- (204) Angoulvant F, Bellettre X, Houhou N, Dexpert JB, Morin L, Siriez JY, et al. Sensitivity and specificity of a rapid influenza diagnostic test in children and clinical utility during influenza A (H1N1) 2009 outbreak. *Emerg Med J* 2010 Oct 13.
- (205) Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Aug 7;58(30):826-9.
- (206) Crum-Cianflone NF, Blair PJ, Faix D, Arnold J, Echols S, Sherman SS, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of an outbreak of novel H1N1 (swine origin) influenza A virus among United States military beneficiaries. *Clin Infect Dis* 2009 Dec 15;49(12):1801-10.
- (207) Faix DJ, Sherman SS, Waterman SH. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009 Aug 13;361(7):728-9.
- (208) Babin SM, Hsieh YH, Rothman RE, Gaydos CA. A meta-analysis of point-of-care laboratory tests in the diagnosis of novel 2009 swine-lineage pandemic influenza A (H1N1). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011 Apr;69(4):410-8.
- (209) Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with

- acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol* 2008 Jul;42(3):268-72.
- (210) Louie JK, Roy-Burman A, Guardia-Labar L, Boston EJ, Kiang D, Padilla T, et al. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009 Apr;28(4):337-9.
- (211) Esper FP, Spahlinger T, Zhou L. Rate and influence of respiratory virus co-infection on pandemic (H1N1) influenza disease. *J Infect* 2011 Apr 15.
- (212) Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009 Jul;45(3):191-5.
- (213) Lee N, Chan PK, Lam WY, Szeto CC, Hui DS. Co-infection with pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza viruses. *Ann Intern Med* 2010 May 4;152(9):618-9.
- (214) Liu W, Li ZD, Tang F, Wei MT, Tong YG, Zhang L, et al. Mixed infections of pandemic H1N1 and seasonal H3N2 viruses in 1 outbreak. *Clin Infect Dis* 2010 May 15;50(10):1359-65.
- (215) Schrauwen EJ, Herfst S, Chutinimitkul S, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, et al. Possible increased pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus upon reassortment. *Emerg Infect Dis* 2011 Feb;17(2):200-8.
- (216) Ducatez MF, Sonnberg S, Hall RJ, Peacey M, Ralston J, Webby RJ, et al. Genotyping assay for the identification of 2009-2010 pandemic and seasonal H1N1 influenza virus reassortants. *J Virol Methods* 2010 Sep;168(1-2):78-81.

- (217) Ghedin E, Laplante J, DePasse J, Wentworth DE, Santos RP, Lepow ML, et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis* 2011 Jan 15;203(2):168-74.
- (218) Follin P, Lindqvist A, Nystrom K, Lindh M. A variety of respiratory viruses found in symptomatic travellers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. *Euro Surveill* 2009 Jun 18;14(24).
- (219) Malcolm E, Arruda E, Hayden FG, Kaiser L. Clinical features of patients with acute respiratory illness and rhinovirus in their bronchoalveolar lavages. *J Clin Virol* 2001 Apr;21(1):9-16.
- (220) Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 May 1;165(9):1285-9.
- (221) Linde A, Rotzen-Ostlund M, Zweygberg-Wirgart B, Rubinova S, Brytting M. Does viral interference affect spread of influenza? *Euro Surveill* 2009;14(40).
- (222) Nisii C, Meschi S, Selleri M, Bordi L, Castilletti C, Valli MB, et al. Frequency of detection of upper respiratory tract viruses in patients tested for pandemic H1N1/09 viral infection. *J Clin Microbiol* 2010 Sep;48(9):3383-5.
- (223) Nougairede A, Ninove L, Zandotti C, Salez N, Mantey K, Resseguier N, et al. Novel virus influenza A (H1N1sw) in South-Eastern France, April-August 2009. *PLoS One* 2010;5(2):e9214.
- (224) Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and

co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol* 2010 Aug;48(4):239-45.

- (225) Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART(R) Pneumovir DNA array. *J Med Virol* 2011 Jan;83(1):150-5.
  
- (226) Utokeparch S, Marchant D, Gosselink JV, McDonough JE, Thomas EE, Hogg JC, et al. The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department. *Pediatr Infect Dis J* 2011 Feb;30(2):e18-e23.